



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน-สมุนไพรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
Preparation of Chitosan-herb Nanoparticles for Aquaculture

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2552-2553
จำนวน 430,000 บาท

หัวหน้าโครงการ ดร. จิราพร โรจน์ทินกร
ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร. อรุณี คงคิ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
มีนาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จาก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีงบประมาณ 2552 โดยเป็นโครงการต่อเนื่อง 2 ปี (2552-2553)

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ที่ให้การสนับสนุนสถานที่และ
สาธารณูปโภคในการทำวิจัย

และขอขอบคุณ นักศึกษาช่วยงาน และบุคลากรในคณะฯ ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยนี้
ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ฉ. ไร่

(ดร. จีราพร โรจน์ทินกร)

มีนาคม 2555

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
สัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	3
คำนำ	5
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	25
ผลการวิจัยและวิจารณ์	30
สรุปผลการวิจัย	60
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่1	ความบริสุทธิ์ (%DD) และขนาดของโมเลกุลโคโคซาน (MW)
30	
ตารางที่2	สรุปขนาดของอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าที่เตรียมได้
40	
ตารางที่3	ขนาดของอนุภาคนาโนโคโคซานที่วัดด้วยวิธีnanosizerโดยใช้โคโค ซาน 96.85 %DD ที่ความเข้มข้น 0.2 % บรรจุด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ ความเข้มข้นต่างๆ
45	
ตารางที่4	อนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้
48	
ตารางที่5	คุณสมบัติของอนุภาคนาโนโคโคซาน
50	

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่1 โครงสร้างของโคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส	8
ภาพที่2 ขั้นตอนการเตรียมโคตินและไคโตซาน	10
ภาพที่3 การเชื่อมโยงพันธะไอออนิกระหว่างหมู่ฟอสเฟตไอออนของโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตกับหมู่แอมโมเนียมไอออนของไคโตซาน	19
ภาพที่4 เจลของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าด้วยวิธีไมโครอิมัลชันและไอออนิกเจเลชัน	31
ภาพที่5 SEM micrographs ของอนุภาคไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชันที่ไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ	32
ภาพที่6 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ	34
ภาพที่7 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 290 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ	35
ภาพที่8 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซาน โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจเลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) โดยเติม glucose 5 % (ก และ ข) และ trehalose 1 % (ค)	36
ภาพที่9 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจเลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%	36
ภาพที่10 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอโอโนโทรปิกเจเลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%	36

ภาพที่11	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 200 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%	37
ภาพที่12	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%	37
ภาพที่13	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%	37
ภาพที่14	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%	38
ภาพที่15	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%	38
ภาพที่16	FTIR spectra ของสารต่างๆและอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าที่สร้างด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน	39
ภาพที่17	ลักษณะของอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าที่การผันแปรความเร็วรอบในการปั่นในปริมาตร 1,500ml	41
ภาพที่18	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้โคโคซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate 60 นาที	42
ภาพที่19	TEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดใบหูกวาง ที่เตรียมโดยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้โคโคซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate 60 นาที	43
ภาพที่20	FTIR spectra ของสารต่างๆและอนุภาคนาโนโคโคซานที่สร้างด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน	44

ภาพที่21	เจลของอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าและบรรจุสารสกัดสมุนไพร	46
ภาพที่22	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่เตรียมด้วยวิธีไอออนิก เจลชัน โดยใช้โคโคซาน ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และเติม trehalose 1%	46
ภาพที่23	SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่เตรียมด้วยวิธีไอออนิก เจลชัน โดยใช้โคโคซาน 85 %DD ขนาด โมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และเติม trehalose 1%	47
ภาพที่24	การปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในหลอดทดลอง	49
ภาพที่25	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กุ้งก้ามกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 15 นาที	51
ภาพที่26	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กุ้งก้ามกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 30 นาที	52
ภาพที่27	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กุ้งก้ามกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	53
ภาพที่28	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กุ้งก้ามกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	54
ภาพที่29	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 15 นาที	55
ภาพที่30	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 30 นาที	56
ภาพที่31	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	57
ภาพที่32	ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	58
ภาพที่33	ประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ <i>Aeromonashydrophila</i> ในปลานิล	59

สัญลักษณ์และคำย่อ

ug	=	microgram
mg	=	milligram
g	=	gram
ul	=	microliter
ml	=	milliliter
um	=	micrometer (micron)
mm	=	millimeter
°C	=	degree Celsius
%	=	percent
%DD	=	% degree of deacetylation

การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน-สมุนไพรเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Preparation of Chitosan-herb Nanoparticles for Aquaculture

จิราพร โรจน์ทินกร⁽¹⁾ และ อรุณี คงดี⁽²⁾

Jiraporn Rojtinakorn⁽¹⁾ and Arunee Kongdee⁽²⁾

(1) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

(2) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน ใช้ tripolyphosphate (TPP) เป็น crosslinker โดยวิธีไมโครอิมัลชัน (microemulsion) และ ไอโอโนโทรปิกเจเลชัน (ionotropic gelation) พบว่า วิธีไอโอโนโทรปิกเจเลชันและใช้ TPP เป็นวิธีที่เหมาะสม เนื่องจากเตรียมได้ง่ายและไม่มีสารพิษตกค้างในอนุภาคนาโน โดยวิธีไอโอโนโทรปิกเจเลชัน (ionotropic gelation) ด้วย 2 ชนิด พบว่า อนุภาคนาโนไคโตซาน-TPP (CS-TPP) โดยใช้ไคโตซาน ที่ความบริสุทธิ์ต่างๆ คือ %DD = 77.09, 81.45, 82.95, 87.31 และ 91.62 และขนาดโมเลกุลต่างๆ คือ 1,519, 139, 385, 253 และ 375 kDa โดยใช้ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% พบว่า จะได้ขนาดอนุภาคนาโนไคโตซานที่แตกต่างกัน คือ การใช้ไคโตซาน 77.09 %DD มี MW 1,519 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 % ได้อนุภาคนาโนขนาดใหญ่ที่สุด 443.00 ± 123.63 nm และ 549.90 ± 39.68 nm ตามลำดับ การใช้ไคโตซาน 81.45 %DD มี MW 139 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% ได้อนุภาคนาโนขนาด 183.50 ± 8.23 nm และ 262.17 ± 5.01 nm ตามลำดับ ในการใช้ไคโตซาน 82.95 %DD มี MW 385 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% ได้อนุภาคนาโนขนาด 254.33 ± 16.46 nm และ 303.87 ± 56.53 nm ตามลำดับ ส่วนการใช้ไคโตซาน 87.31 %DD มี MW 253 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% ได้อนุภาคนาโนขนาด 242.70 ± 26.80 nm และ 517.83 ± 111.47 nm ตามลำดับ และการใช้ไคโตซาน 91.62 %DD มี MW 375 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% ได้อนุภาคนาโนขนาด 211.33 ± 10.90 nm และ 299.93 ± 64.84 nm ตามลำดับ

ได้ทำการแปรผันความเร็วในการกวน 900 – 1,300 rpm พบว่า ขนาดอนุภาคนาโนไคโตซานไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่า การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าด้วยวิธีไอโอโนโทรปีคเจเลชันที่เหมาะสม คือ การใช้ไคโตซานขนาด 81.45 %DD ขนาดโมเลกุล 139 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2% ใช้ TPP 1.0 mg/ml ในอัตราส่วนปริมาตร 2 : 1 ที่การกวน 900 – 1,300 rpm โดยได้อนุภาคนาโนทรงกลม ขนาดเล็ก มีความผันแปรต่ำ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ให้โครงสร้างของอนุภาคนาโนเป็นทรงกลม มีขบวนการง่าย ไม่สลับซับซ้อน ไม่ต้องใช้สารกำจัดน้ำมัน และไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนซึ่งจะต้องให้ปลาและกุ้งกินต่อไป

ได้ทำการบรรจุสารสกัดเปลือกมังคุด (magosteen peel extract, MPX) ในอนุภาคนาโนไคโตซาน ที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพด้วยเทคนิค SEM และ nanosizer พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่มากขึ้น คือ 204.40 ± 18.98 , 280.43 ± 20.64 , 925.13 ± 50.81 , 1303.67 ± 248.92 , 2442.67 ± 346.09 และ 2851.33 ± 518.30 nm ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการบรรจุที่ความเข้มข้นของสารสกัด 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) เท่ากับ 70.53, 71.42, 72.47, 76.81 และ 68.41 % ตามลำดับ

สำหรับประสิทธิภาพการปลดปล่อยในหลอดทดลอง ที่ความเข้มข้นของสารชีวภาพ 1.5 % (w/v) pH = 7.0 สารสกัดใบหูกวางเริ่มถูกปลดปล่อยตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมง และปลดปล่อยได้สูงสุด 75.03% ส่วนประสิทธิภาพการปลดปล่อยในลำไส้สัตว์น้ำ พบว่า ในกุ้งก้ามกรามและปลานิลอนุภาคนาโนไคโตซานสามารถถูกย่อยได้ที่ลำไส้ส่วนต้น ที่เวลา 15 นาทีหลังกินอาหาร โดยที่เวลา 2 ชั่วโมง หลังกินอาหาร สารชีวภาพจะกระจายไปทั่วลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางและส่วนปลาย

ABSTRACT

This project constructed chitosan nanoparticle using tripolyphosphate (TPP) as crosslinker by micro-emulsion and ionotropic gelation techniques. It was shown that ionotropic gelation with TPP was the satisfied method because of ease strategy and without toxic residue in nanoparticle. With ionotropic gelation method, chitosan-TPP (CS-TPP) was constructed by using chitosan at different purity; %DD = 77.09, 81.45, 82.95, 87.31 and 91.62, and different molecular weight at 1,519, 139, 385, 253 and 375 kDa, with 0.2 and 0.5 %. Vary size of CS-TPP nanoparticles were performed. Using 77.09 %DD with MW 1,519 kDa at 0.2 and 0.5 % formed the largest size of nanoparticle with 443.00 ± 123.63 nm and 549.90 ± 39.68 nm, respectively. Using 81.45 %DD with MW 139 kDa at 0.2 and 0.5% formed nanoparticle sizes of 183.50 ± 8.23 nm and 262.17 ± 5.01 nm, respectively. Using 82.95 %DD with MW 385 kDa at 0.2 and 0.5% formed nanoparticle sizes of 254.33 ± 16.46 nm and 303.87 ± 56.53 nm, respectively. Using 87.31 %DD with MW 253 kDa at 0.2 and 0.5% formed nanoparticle sizes of 242.70 ± 26.80 nm and 517.83 ± 111.47 nm, respectively. Whereas using 91.62 %DD with MW 375 kDa at 0.2 and 0.5% formed nanoparticle sizes of 211.33 ± 10.90 nm and 299.93 ± 64.84 nm, respectively. Stirring rate was varied from 900 rpm to 1,300 rpm, this was resulted that size of nanoparticle was not significant different. Therefore, it was concluded that construction of chitosan nanoparticle by ionotropic gelation, using chitosan 81.45 %DD with MW 139 kDa at 0.2%, using TPP 1.0 mg/ml with ratio of 2 : 1, and stirring at 900 – 1,300 rpm achieved circular and small nanoparticle with low variation in size. Furthermore, the process was ease, not complicate, not need to use de-oil reagent, and no residue in nanoparticle product that have to feed in fish and shrimp.

Encapsulation of magosteen peel extract (MPX) in CS-TPP nanoparticle by ionotropic gelation was performed by using chitosan 81.45 %DD with MW 139 kDa at 0.2%, using TPP 1.0 mg/ml with ratio of 2 : 1, and stirring at 900 – 1,300 rpm. Their physical characteristic was investigated by SEM and nanosizer. Efficiencies of encapsulation and releasing were identified by dialysis technique and protein and tannin were measured. At IAX concentration of 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % (w/v), the loading efficiencies were 70.53, 71.42, 72.47, 76.81 and 68.41 %, respectively.

For in vitro releasing efficiency, 1.5 % (w/v) MPX in nanoparticle was released from 1 hour for 75.03 % at pH = 7.0 . Whereas, for in vivo releasing efficiency, biosubstance was released from 15 minute after feed and distributed through foregut, midgut and hindgut in both giant prawn and tilapia.



คำนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไคโตซาน (-1,4-D-glucosamine) เป็นโพลีแซคคาไรด์สายตรง นับว่าเป็นไบโอดีเมอร์ที่มีมากเป็นอันดับสอง รองจากเซลลูโลส ไคโตซานได้มาจากการ deacetylation ของไคติน (-1,4)- (N-acetyl glucosamine) ซึ่งมีมากในเปลือกของกุ้งและปู ไคโตซานจัดเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดหนึ่ง ด้วยคุณสมบัติเป็น cationic substance เป็นสารย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ไม่เป็นสารพิษ นอกจากนี้โมเลกุลไคโตซานยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมากมาหลายหลากหลายวัตถุประสงค์ ทั้งในทางด้านการแพทย์ เวชสำอางค์ สิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร วิศวกรรมชีวภาพ รวมถึงการบำบัดน้ำเสีย และการบำบัดโลหะหนักในน้ำ

การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยา สารชีวเคมี และด้านการแพทย์ เช่น การสร้าง immunosensor electrode โดยการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิว (Lei et al., 2003) การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-hydroxyapatite (Hap) (Chen et al., 2004) และอนุภาคนาโน chitosan-calcium phosphate cement (CPC) (Xu et al., 2007) เพื่อช่วยเสริมสร้างการปลูกถ่ายเซลล์กระดูก การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน-วัคซีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและการนำพาเข้าสู่เซลล์ (Borges et al., 2006; Amidi et al., 2007; Zhou et al., 2007) การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-DNA เพื่อนำเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย (Nie and Wang, 2007) การตรึงเอนไซม์ไลเปสในสภาพ chitosan-lipase nanoparticle เพื่อใช้ในการผลิต glycerol และ fatty acid ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Tang et al., 2007) เป็นต้น

ส่วนการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนไคโตซานในด้านประมงยังรายงานมีน้อยมาก จากการสืบค้นในฐาน ข้อมูล www.sciencedirect.com ณ วันที่ 13 สิงหาคม 2550 พบเพียง 5 รายงาน เท่านั้น ได้แก่ 1) การสร้าง chitosan-alginate microcapsule เพื่อนำพา Vibrio vaccine โดยการผสมอาหารกิน (Polk et al., 1994) 2) การเตรียมอนุภาคนาโน chitosan-plasmid DNA เพื่อใช้ในการนำพา DNA vaccine เข้าร่างกายปลา rainbow trout โดยการแช่ในความเข้มข้น 5 - 15 ug/ml (Romøren et al.,

2002) และ 3) การเตรียมเซลล์ microcapsule ของไมโครอัลจี *Haematococcus pluvalis* เคลือบโคโคซาน เพื่อรักษารังควัตถุแดง astaxanthin ได้นานถึง 24 สัปดาห์ (Kittikaiwan et al., 2007)

จะเห็นได้ว่า ถึงแม้เทคโนโลยีอนุภาคนาโนโคโคซานกำลังถูกพัฒนาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่การศึกษาวิจัยด้านการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อยมาก และยังไม่มีการศึกษาวิจัยในระดับอนุภาคนาโนชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย การเพาะ เลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ เป็นแหล่งผลิตโปรตีนคุณภาพสูงที่มีราคาไม่แพง เช่น ปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้เข้าประเทศสูง โดยเฉพาะการส่งออกกุ้งทะเลที่มีมูลค่าปีละไม่น้อยกว่า 2000 ล้านบาท

การใช้สารสกัดสมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะเป็นแนวทางหนึ่งในการลดยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ ผู้วิจัย จิราพรและคณะ (2549) รายงานว่ามีสารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในสัตว์น้ำ เช่น กระเทียม ขะพลูด หูกวาง เปลือกมังคุด เปลือกทับทิม ชาเขียว รวงจืด เป็นต้น แต่เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติทำให้เกิดการสลายตัวและนำเสียดัง่ายทั้งในรูปผงแห้งและของเหลว ดังนั้นอุปสรรคในการผลิตสารสกัดสมุนไพรเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ วิธีการเก็บรักษา และอายุการเก็บ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจในการพัฒนาวิธีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนาโนชีวภาพ

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนของสารสกัดสมุนไพร โดยใช้ชีวโมเลกุลโคโคซาน
- 2.2 เปรียบเทียบการเตรียมอนุภาคนาโนโคโคซาน/สารสกัดสมุนไพร โดยใช้โคโคซานขนาดต่างๆ
- 2.3 ศึกษาขนาดและโครงสร้างของอนุภาคนาโนโคโคซาน/สารสกัดสมุนไพร
- 2.4 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซาน/สารสกัดสมุนไพรในการฆ่าเชื้อโรคของสัตว์น้ำ
- 2.5 ศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนโคโคซาน/สารสกัดสมุนไพรในสัตว์น้ำ
- 2.6 ศึกษาอายุการเก็บอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่อุณหภูมิต่างๆ

การตรวจเอกสาร

1. ไคตินและไคโตซาน

ไคติน (β -(1,4)- (N-acetyl glucosamine) มีมากในเปลือกของกุ้งและปู เป็นไบโอโพลิเมอร์ที่มีมากเป็นอันดับสอง รองจากเซลลูโลส ไคติน-ไคโตซาน (Chitin-Chitosan) เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติระหว่างสองมอนอเมอร์ของ Anhydro-N-Acetyl-D-Glucosamine และ Anhydro-D-Glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของมอนอเมอร์แรกมากกว่าจะแสดงลักษณะเด่นเป็นไคติน แต่ถ้าสัดส่วนที่อยู่ด้วยกันของมอนอเมอร์ที่สองมากกว่าจะแสดงลักษณะสมบัติเด่นเป็นไคโตซาน ซึ่งลักษณะโพลิเมอร์นี้จะมีผลต่อเนื่องไปยังสมบัติการละลายของไคติน-ไคโตซาน (Hirano, 1996; Muzzarelli, 1977)

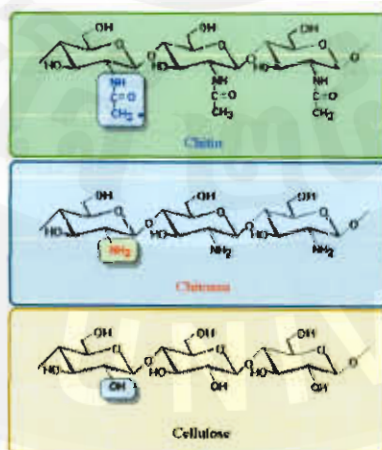
ไคตินไม่สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วและไม่มีขั้ว โดยทั่วไปมักพบไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา รวมทั้งเปลือกของแมลงและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีข้อและปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนหมึก (Merk, 1996) จากการศึกษาของ Muzzarelli (1977) ได้ทำการเสนอรูปแบบของผลึกไคตินในธรรมชาติซึ่งมีโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรงอยู่ 3 ลักษณะ ขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ ได้แก่ อัลฟาไคติน พบในเปลือกกุ้งและกระดองปู เบตาไคติน พบในแกนหมึก และแกมมาไคติน พบในเห็ด รา แต่ละลักษณะจะแตกต่างกันที่ระบบการเกิดระบบผลึก (Crystal System)

ไคโตซาน (β -1,4-D-glucosamine) หรือ D-glucosamine(2-amino-2-deoxy-D-glucose) หรือ Poly- β (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose มีสูตรทั่วไปเป็น $(C_6H_{11}NO_4)$ (ลิลา, 2542; ภาวดี และคณะ, 2543) ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 44.7 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.8 และไนโตรเจนร้อยละ 8.7 (Muzzarelli, 1977) เป็นโพลิแซ็กคาไรด์สายตรง เป็นอนุพันธ์ของไคติน ได้มาจากการกำจัดหมู่อะซิติก(deacetylation)ของไคติน โดยหมู่อะซิติกของไคตินถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจนกลายเป็นหมู่เอมีน($-NH_2$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

จากการหายไปของหมู่อะซิติก ทำให้ไคโตซานมีส่วนของโมเลกุลที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาอย่างว่องไวอยู่หลายหมู่ หมู่ที่เด่นๆ คือหมู่เอมีนในตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หมู่แอลกอฮอล์

ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 และหมู่แอลกอฮอล์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และเพราะมีหมู่ที่ไวต่อปฏิกิริยานี้เองทำให้ไคโตซานถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางมากกว่าไคติน โดยหน้าที่การทำงานของ มันจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี และการสร้างโมเลกุลของไคโตซาน (Molecular conformation of chitosan) ซึ่งการเกิดไคโตซานขึ้นอยู่กับระดับการกำจัดหมู่อะซิติลโดยคิดเป็นร้อยละ (%DD) ถ้าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเกินกว่า 50% ขึ้นไป ไคโตซานนั้นสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ได้ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ การลดลงของหมู่อะซิติล ($\text{CH}_3\text{CO}-$) ในไคตินทำให้เกิดการเพิ่มของหมู่เอมีน ซึ่งเป็นการเพิ่มคุณสมบัติการเป็นประจุบวก (polycationic) ในสายพอลิเมอร์ทำให้เกิดเป็นสภาพไคโตซานมากขึ้น (chitosan generation) เพราะฉะนั้นโครงสร้างของไคตินจึงต่างจากโครงสร้างของไคโตซานตรงหน่วยกลูโคซามีน (glucosamine) ในสายพอลิเมอร์ (Shigemasa, 1998)

โครงสร้างทางเคมีของไคโตซานจัดเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดหนึ่ง ด้วยคุณสมบัติเป็น cationic substance เป็นสารย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ไม่เป็นสารพิษ นอกจากนี้โมเลกุลไคโตซานยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมากมาหลายหลายวัตถุประสงค์ ทั้งในทางด้านการแพทย์ เวชสำอาง สิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร วิศวกรรมชีวภาพ รวมถึงการบำบัดน้ำเสีย และการบำบัดโลหะหนักในน้ำ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส

ที่มา : <http://dalwoo.tripod.com/structure.htm>

กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

กรรมวิธีการผลิตไคตินและไคโตซานมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งวิธีทางเคมีและทางชีวภาพซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้วิธีทางเคมีดังแสดงในภาพ 3 และวัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากกากของเหลือในอุตสาหกรรมอาหารทะเลเช่นแฉ่งแฉ่งอาทิตย์เปลือกกุ้งหัวกุ้ง กระดองปู และแกนหมึก โดยสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไคตินและไคโตซานที่ได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Species) ของสัตว์เหล่านี้รวมถึงกรรมวิธีการผลิตดังนั้นกระบวนการผลิตที่นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาผสมผสานกับกระบวนการผลิตทางเคมีจึงมีการพัฒนาขึ้นเพื่อให้ได้สมบัติของผลิตภัณฑ์ไคตินและไคโตซานตามต้องการและเหมาะสมกับการนำไปใช้

การผลิตไคตินและไคโตซาน ประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) กระบวนการกำจัดโปรตีน (Deproteinization)

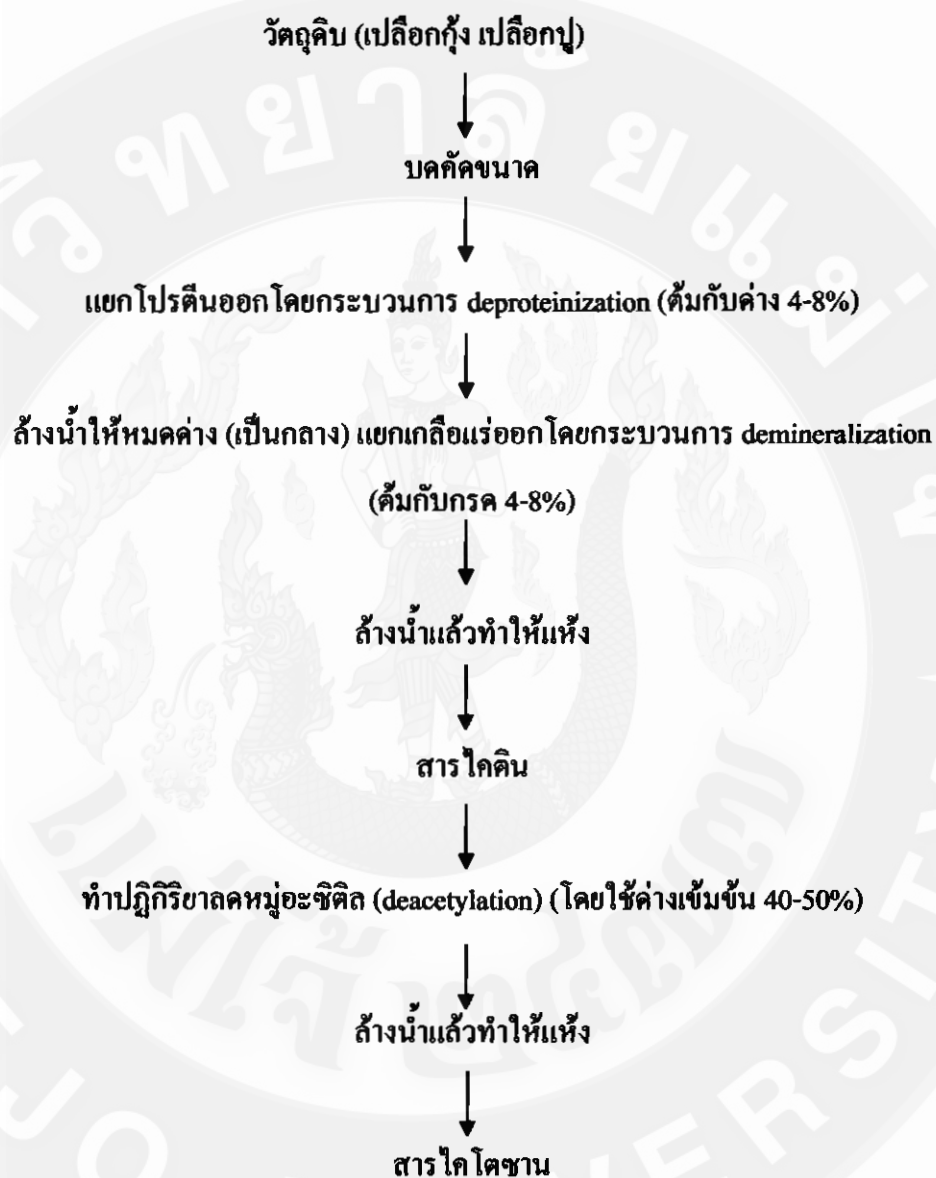
โดยการนำวัตถุดิบ ได้แก่ เปลือกกุ้ง เปลือกปู ฯลฯ มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10% และอุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 65-100°C นอกจากนี้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (reaction time) ขึ้นอยู่กับวิธีและสถานะที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (No and Meyers, 1997) ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไปจากวัตถุดิบซึ่งทำให้ไขมันบางส่วนและรงควัตถุบางชนิดมีโอกาสดูดซับกำจัดออกไปด้วย

2) กระบวนการกำจัดเกลือแร่ (Demineralization)

โดยการนำวัตถุดิบซึ่งผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนมาแล้ว มาทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจางที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกลือแร่ส่วนใหญ่ ได้แก่ หินปูน (CaCO_3) ถูกเปลี่ยนเป็นเกลือที่ละลายน้ำ (CaCl_2) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ดังสมการที่ 1 และพร้อมกันนี้ทำให้บางส่วนของรงควัตถุและโปรตีนที่ละลายได้ในกรดขอมถูกกำจัดออกไปด้วยในขั้นตอนนี้ด้วยเช่นกัน วัสดุที่ได้หลังจากการกำจัดเกลือแร่คือ คือ ไคติน (Chitin)



สมการที่ 1

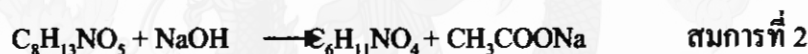


ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมไคตินและไคโตซาน

หากเปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคตินระหว่างเปลือกปูและเปลือกกุ้งพบว่าการแยกแร่ธาตุออกจากเปลือกปูจะกระทำได้ง่ายกว่าเปลือกกุ้งและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ใช้ในการแยกแร่ธาตุไม่ควรน้อยกว่า 0.7 โมลาร์อย่างไรก็ตามการใช้กรดมากเกินไปจะทำให้หน้าหนัก โมเลกุลของไคโตซานลดลง (Myint et al., 2002)

3) กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติก(Deacetylation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติก เพื่อให้เกิดเป็นไคโตซาน ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่เอมิโนบนโมเลกุลของไคติน ดังสมการที่ 2 และหมู่เอมิโนนี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลาย ซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้นเพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก ส่วนใหญ่เมื่อปริมาณของหมู่อะซิติกถูกกำจัดไปมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สารไคโตซานที่ได้สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด อาทิเช่น กรดอะซิติก กรดแลกติก และกรดซิตริก เป็นต้น การลดหมู่อะซิติกกระทำได้โดยใช้ค่าที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ดังนั้น พารามิเตอร์ที่สำคัญในการพิจารณาสารไคโตซานก็คือ ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (%DD) (สุวดี, 2542)



คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของไคติน-ไคโตซาน

1)การละลาย (Solubility)

ไคตินจะไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ค่างทั้งเจือจาง และเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ความยากในการละลายของไคตินในตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันอย่างหนาแน่นมีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายใน และระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันคือ หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่อะซิตามิโด

ไคโตซานไม่ละลายน้ำ ค่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก และ กรดไฮโดรคลอริก สามารถละลายไคโตซานได้เช่นกัน แต่ภายใต้อุณหภูมิที่สูงปานกลาง อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น (สุวบุญ และคณะ, 2544)

2)น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

น้ำหนักโมเลกุลเป็นสมบัติที่สำคัญในการบอกสมบัติทั้งทางกายภาพ และทางเคมีของไคโตซาน โดยทั่วไปไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 1×10^6 ในขณะที่ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง $1 \times 10^5 - 1.2 \times 10^6$ ขึ้นอยู่กับขั้นตอนในการผลิต การหาน้ำหนักโมเลกุลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ศึกษาสมบัติการกระเจิงของแสง การศึกษาสมบัติความหนืด และการใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี (วิภาวี, 2543)

3)ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (Degree of Deacetylation, %DD)

เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นไคติน ไคโตซาน เนื่องจากไคติน ไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างสองมอนอเมอร์ของ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ถ้าสัดส่วนที่อยู่รวมกันของมอนอเมอร์แรกมากกว่าจะมีค่า ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกต่ำจะแสดงสมบัติเด่นของไคติน ถ้าสัดส่วนของมอนอเมอร์หลังมากกว่าจะมีค่า ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกสูงจะแสดงสมบัติเด่นของไคโตซาน เช่น การละลาย ความหนืด การดูดความชื้น การดูดซับไขมัน และความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการนำไปประยุกต์ใช้ (มงคล, 2544)

4)ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของสารละลายไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (%DD) น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น ionic strength ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้ และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าพีเอช (pH) ลดลง ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อ พีเอช (pH) ของสารละลายเพิ่มขึ้น

5)การจับตัว (Coagulating ability)

ไคโตซานเป็นตัวสร้างตะกอนและตัวตกตะกอน (flocculant and coagulating agent) ที่ดี เนื่องจากการมีหมู่เอมีโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวก และจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีข้อม และพอลิเมอร์อื่น จากการวิจัยประสิทธิภาพของไคโตซานในการแยกโปรตีนออก

จาก cheese whey พบว่าความสามารถในการจับโปรตีนเป็นส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของโคโคซาน นอกจากนี้โคโคซานยังสามารถจับโลหะหนักได้ โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของโคโคซานจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ไอออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อน (coordinate) กับหมู่อะมิโนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่อะมิโนของโคโคซานมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซิติกในไคติน ดังนั้นโคโคซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (%DD) สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะสูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของโคโคซานยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น ความเป็นผลึก และความสามารถในการคั่งคูลน้ำของโคโคซาน (Li et al., 1992)

6) Molecular conformation

ไคตินมีโครงสร้างของผลึก (crystal structure) ที่แข็งแรงและมีระดับของผลึก (degree of crystallinity) สูง รูปแบบผลึกของไคตินมี 3 ลักษณะ คือ α -chitin, β -chitin และ γ -chitin แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่การเกิดระบบของผลึก (crystal system) และปัจจัยของการเกิดแลตติซผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซลล์ (unit cell) ภายในโครงสร้างผลึก ความแตกต่างนั้นเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในแลตติซผลึก สายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินจะมีการเรียงตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกัน (pleated sheet) ในแลตติซผลึกของหน่วยเซลล์ ซึ่งอาจเรียงตัวกันได้ 2 แบบ คือ แบบขนานที่ม้วนไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกันแบบสวนทางกัน (anti-parallel pattern) α -chitin มีโครงสร้างการเรียงตัวแบบสวนทางกัน พบในไคตินของเปลือกกุ้ง และปู ส่วนไคตินที่พบในแกนปลาหมึกจะมีโครงสร้างที่เรียงตัวม้วนไปทางเดียวกัน เกิดเป็น β -chitin การจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแบบ γ -chitin นั้นเกิดจากโครงสร้างเรียงสลับกันระหว่างสองแบบที่กล่าวมาแล้ว

โดยธรรมชาติจะพบ α -chitin ของไคตินมากกว่า β -chitin และ γ -chitin ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular และ intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี (chemical stability) มากกว่าแบบอื่น β -chitin มีเสถียรภาพทางเคมีรองลงมาจาก α -chitin ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า การมีเสถียรภาพที่น้อยทำให้มันมีโอกาสเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจาก β -form เป็น α -form ใน

สารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวร เป็นโคตินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ได้อีกทางหนึ่ง

โคโคซานเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์ประเภทบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากในสารละลายกรดหมูอะมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับโปรตอน แล้วอยู่ในรูป -NH^+ , conformation ของโคโคซาน โมเลกุลในสารละลาย สามารถบ่งชี้โดยค่า Mark Houwink exponent (ค่า a) ถ้า a มีค่าประมาณ 0, 0.5-0.8 และ 1.8 บ่งชี้ว่าพอลิเมอร์ขดตัวเป็นทรงกลม (sphere) มีลักษณะเป็น random coil และมีลักษณะเป็นแท่ง (rod) ตามลำดับ conformation ของโคโคซานโมเลกุลที่แตกต่างกันในสารละลายขึ้นอยู่กับ ionic strength ค่า pH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของยูเรีย น้ำหนักโมเลกุล และระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (degree of deacetylation, %DD) (Chen and Tsaih, 1998)

7) การเสื่อมสลาย (Degradation)

โคติน-โคโคซานก็เหมือนกับพอลิเมอร์หรือพอลิแซ็กคาไรด์อื่นทั่วไป คือเมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็น โอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่า มโนเมอร์ (monomer) หรือ มโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide)

โอลิโกเมอร์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ของโคตินและโคโคซาน คือ *N*-acetyl-chitooligosaccharide และ chitooligosaccharides ตามลำดับ ส่วน มโนเมอร์ มโนแซ็กคาไรด์ของโคตินและโคโคซานคือ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ

7.1) การเสื่อมสลายโดยกรด (acid hydrolysis)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของโคโคซานเนื่องจากกรดเป็นแบบสุ่ม (random) ผลึกภัณฑ์ที่ได้คือ โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และ มโนเมอร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของพอลิเมอร์ โดยโคตินจะสามารถต้านทานต่อการเสื่อมสลายโดยกรดได้ดีกว่าโคโคซาน

7.2) การเสื่อมสลายโดยด่าง (alkaline degradation)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของโพลีแซ็กการไรด์ในค้างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล การเสื่อมสลายแบบนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า peeling reaction

7.3)การเสื่อมสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียง (Degradation by sonication)

การเสื่อมสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียงควบคู่กับการใช้กรด มีผลให้ได้โพลิโกเมอร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าการเสื่อมสลายโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว

7.4)การเสื่อมสลายโดยเอนไซม์ (Enzymic degradation)

การเสื่อมสลายโดยใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีคือ มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้สารเคมี เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไคติน-ไคโตซาน ได้แก่

chitinase สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม (random) ตรงตำแหน่งพันธะ 1, 4-linkage ได้เป็น *N*-acetyl-chitooligosaccharide

chitosanase สามารถย่อยสลายสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานแบบสุ่ม (random) ตรงตำแหน่งพันธะ 1, 4-linkage ได้เป็น chitooligosaccharide

lysozyme เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายกับ chitinase

N-acetylglucosaminidase และ *N*-acetylhexosaminidase ทำหน้าที่ย่อยสลาย *N*-acetylchitooligosaccharides เป็น *N*-acetyl-glucosamine โดยเริ่มจากปลายสายโซ่โมเลกุล (non-reducing end)

7.5)การเสื่อมสลายโดยความร้อน (Thermal degradation)

ความร้อนมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน จากการวิจัย พบว่า ความร้อนจากเตาอบซึ่งเป็นความร้อนแบบแห้ง (dry heat) ที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 80 °C มีผลทำให้สายโซ่โมเลกุลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น Glass transition temperature (T_g) ลดลง ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ส่วนความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิสูง มีผลทำให้ไคโตซานเกิดสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลา ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 120 °C ความสามารถในการละลายของไคโตซานจะลดลง ที่อุณหภูมิ 160 °C เวลานานกว่าหรือเท่ากับ 2 ชั่วโมง ไคโตซานจะไม่ละลายในกรดอะซิติก (0.2 M)/โซเดียมอะซิเตด (0.1 M)

สำหรับการอบแห้งแบบใช้ไอร้อน (saturated steam) ไคโดซานจะไม่สามารถละลาย หลังจากการอบที่อุณหภูมิ 115 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหลังการอบที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 120 °C ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ต่อสมบัติทางกายภาพของไคโดซาน (Lim et al, 1999)

8) ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา

ไคโดซานประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชันที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือ หมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง (C-2) หมู่ Primary Alcohol (CH_2OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่หก (C-6) และหมู่ Secondary Alcohol (CHOH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สาม (C-3) การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี (Chemical Modification) ของทั้งสามหมู่ฟังก์ชันนี้สามารถก่อให้เกิดวัสดุต่างๆ ในการใช้งานที่แตกต่างกัน (ภาวดี และคณะ, 2543) การนำไปใช้งานนี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมี และกายภาพ ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่อะซิดิลความชื้นปริมาณได้ ปริมาณโปรตีน ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น

สมบัติที่สำคัญของไคติน-ไคโดซาน

สมบัติที่สำคัญของชาติไคติน-ไคโดซาน มีดังต่อไปนี้

1. เป็นวัสดุทางชีวภาพ (Biomaterial) ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) และเป็นสารที่มีส่วนร่วมในกิจกรรมทางชีวภาพ (Bioactivity) อีกทั้งย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Biodegradable) สามารถนำมาเป็นสารตั้งต้น (Precursor) ในการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม (Value Added Product) ต่าง ๆ และสารอนุพันธ์อื่น ๆ ได้มากมาย ดังนั้นจึงปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (Chang et al., 1997; Hirano, 1996; Muzzarelli, 1977)
2. ไคโดซานเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (Positive Charge) สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับของแข็งอินทรีย์ (Organic Solid) และพื้นผิวเซลล์ (Cell Surface) ที่มีประจุลบ ดังนั้นจึงนิยมประยุกต์ใช้ไคโดซานในอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย (เขาวภา, 2534; Hirano, 1996; Win, 1996)
3. สามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเจล (Gel) เม็ด (Bead) เส้นใย (Fiber) สารละลาย (Solution) คอลลอยด์ (Colloid) ฟิล์ม (Film) และสารเคลือบ (Coat) เป็นต้น ทำให้การประยุกต์ใช้งาน

แตกต่างกัน เช่น ถ้าเป็นเจลหรือสารละลายก็จะใช้ในเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารช่วยตกตะกอน ใช้เป็นสารเคลือบผิว ใช้เป็นสารต่อต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (Bacteriostatic agent and Fungistatic agent) เป็นฟิล์มจะใช้งานด้านตกแต่งบาดแผลเป็นสารเคลือบไดอะไลซิสเมมเบรน (Dialysis Membrane) เป็นต้น (Shigemasa et al. 1998)

การวิเคราะห์คุณภาพโคโคซาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์มาตรฐานของโคโคซาน ตั้งแต่เป็นวัตถุดิบ โดยนำโคโคซานที่อยู่ในรูปผงมาทำการละลายในกรดอินทรีย์เข้มข้น 1% จนละลายหมด แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าคุณสมบัติดังนี้

1. ค่าการกำจัดหมู่อะซิติล (Degree of Deacetylation, %DD) จะเป็นตัวชี้ว่าสารที่นำมาวิเคราะห์มีคุณสมบัติความเป็นโคโคซานมากน้อยแค่ไหน โดยพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์ของ กำจัดหมู่อะซิติล ถ้ามี %DD สูงกว่า 70% แสดงว่าเป็นสารโคโคซานที่สามารถนำมาใช้ได้ แต่ถ้ายิ่งสูงกว่า 90% ก็แสดงว่าโคโคซานนั้นมีคุณภาพสูงเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ โดยวิธีวิเคราะห์หาค่า %DD ซึ่งเป็นมาตรฐานในต่างประเทศ คือ วิธีการวิเคราะห์โดยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy , FT-IR)

2. การหาน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) ของโคโคซาน ซึ่งมีความแตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้งานที่แตกต่างกัน ตามวัตถุประสงค์การใช้งาน โดยมีวิธีการวัดน้ำหนักโมเลกุล อาทิเช่น การวัดความหนืดของสารละลาย และ เจลเพอร์มิเอชันโครมาโตกราฟี เป็นต้น

3. ความบริสุทธิ์ของโคโคซาน (Purity) จะวัดจากปริมาณสารปนเปื้อนต่างๆ ที่มีอยู่ในวัตถุดิบของโคโคซาน สารปนเปื้อนส่วนใหญ่ได้แก่ โลหะหนัก เศษโปรตีน ในโคโคซานที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตอาหาร สาเหตุการปนเปื้อนอาจเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมหรือแหล่งน้ำที่จับสัตว์น้ำที่เป็นวัตถุดิบขึ้นมา เช่น ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ ตลอดจนจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Vibrio spp.* วิธีการตรวจวัดสารปนเปื้อนต่างๆ สามารถทำได้โดยใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์สารปนเปื้อนในอาหาร (กำไร, 2543)

2. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน

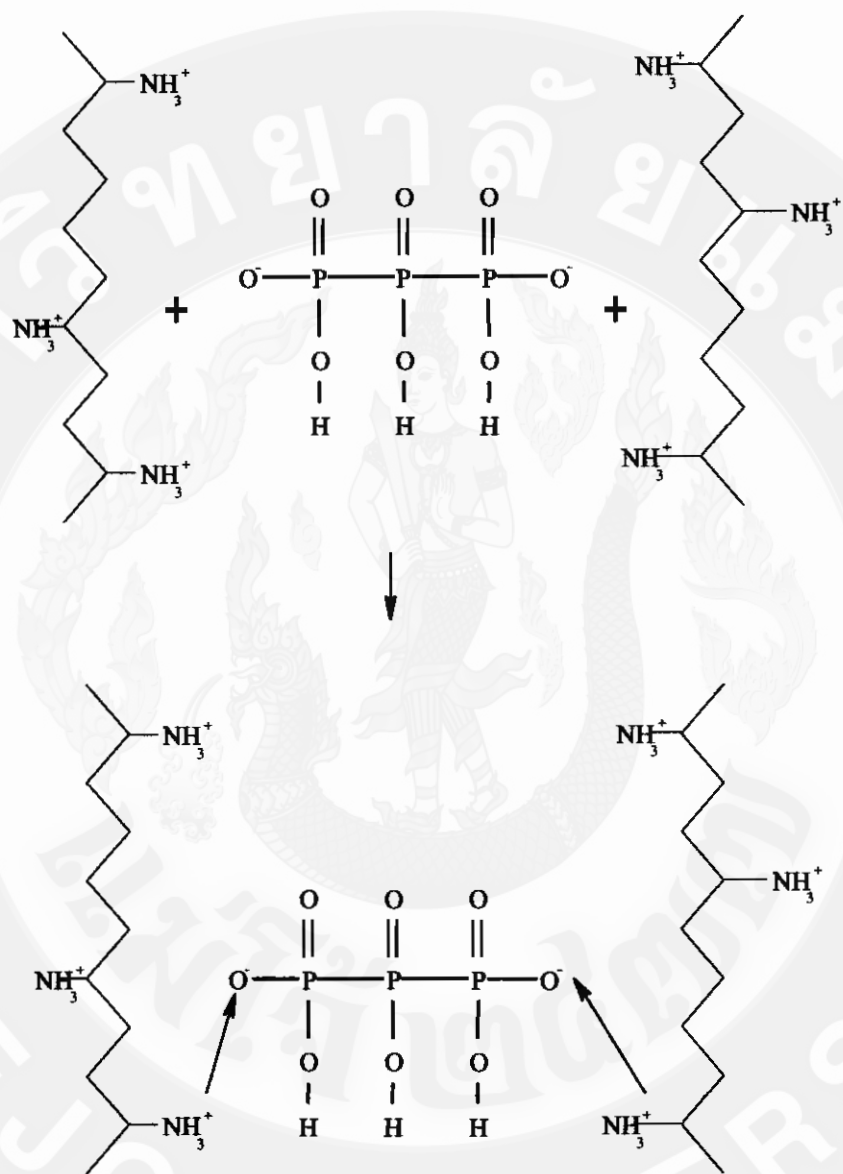
ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไคโตซานมีหลายวิธี สำหรับการวิจัยนี้ใช้ 2 วิธี ได้แก่

1) เทคนิคอิมัลชัน (Emulsion technique)

เป็นการเตรียมอนุภาคนาโนด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิว เกิดการทำปฏิกิริยาเชื่อมขวางกัน (cross linking) ระหว่างกลุ่มเอมีนซึ่งมีประจุบวกจากไคโตซานกับกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งมีประจุลบจากสารไตรฟอสเฟตซึ่งเกิดขึ้นภายในไมเซลล์

2) เทคนิคไอออนิกเจลเลชัน (Ionic gelation technique)

การเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน (Chitosan nanoparticles) ด้วยเทคนิคไอออนิกเจลเลชัน (ionic gelation technique) ถูกรายงานโดย Calvo et al (1997) จะอาศัยหลักการของแรงดึงดูดระหว่างประจุที่ตรงกันข้ามของสารละลายพอลิเมอร์ในน้ำที่เจือจางหรือสารละลายพอลิเมอร์ในน้ำที่เจือจางกับสารประกอบที่มีประจุตรงกันข้ามกับพอลิเมอร์เกิดเป็นอนุภาคนาโน (nanoparticles) ดังแสดงในภาพ 4 เทคนิคไอออนิกเจลเลชันเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เตรียม polymeric nanoparticles เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกเครื่องมือที่ใช้ไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีปัจจัยต่างๆ มากมายที่ต้องศึกษาหรือควบคุม เช่น ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ สัดส่วนของพอลิเมอร์ที่ใช้ ชนิดของพอลิเมอร์ อัตราเร็วในการกวน และ ขนาดของเข็มที่ใช้หยดสารละลาย เป็นต้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่เตรียมขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียม polymeric nanoparticles



ภาพ 3 การเชื่อมโยงพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ฟอสเฟตไอออนของโฮเดียมไตรฟอสเฟต
กับหมู่แอมโมเนียมไอออนของโคโคซาน

ที่มา : Mi et al. (2003)

3. การใช้ประโยชน์ไคตินและไคโตซาน

มีการนำไคตินและไคโตซานไปใช้ในด้านต่างๆ มากมายหลายด้าน ได้แก่

1)ด้านการเกษตร

การศึกษาวิจัยเพื่อนำสาร ไคติน-ไคโตซานมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรทั้งพืชและสัตว์ได้เกิดขึ้นอย่างแพร่หลายเนื่องจากการใช้ไคตินและไคโตซานให้ผลดีในแง่ของการเป็นสารธรรมชาติที่ช่วยลดความเสี่ยงของเกษตรกรและผู้บริโภคต่อการได้รับสารพิษจากปุ๋ยและยาปราบศัตรูพืช พร้อมทั้งมีจุดเด่นที่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิต ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาพืชผลทางการเกษตร ใช้เป็นสารปรับสภาพดินสำหรับเพาะปลูก ใช้ในการเคลือบเมล็ดพืช ใช้ผลิตอุปกรณ์ทางการเกษตร รวมถึงสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้และปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม การใช้ประโยชน์จากไคตินและไคโตซานทางด้านการเกษตร สามารถนำไปใช้ได้เกือบทุกขั้นตอนหรือเกือบครบวงจร ส่วนการศึกษาในกรณีของสัตว์ พบว่า ไคโตซานสามารถใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสุกรได้ โดยให้อัตราแลกเนื้อเพิ่มขึ้นและสามารถลดปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะได้ในปริมาณมาก ทำให้สุกรมีสุขภาพแข็งแรงขึ้น ลดอาการป่วยของสุกรภายในฟาร์ม และลดต้นทุนการผลิตลงได้ (ปิยะบุตร, 2543) นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ไคโตซานผสมในอาหารสำหรับกบไก่เนื้อ (ปิยะบุตร และสุวดี, 2543) และเป็ดเนื้อ (ปิยะบุตร และคณะ, 2543) ซึ่งมีผลทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตดี ขนสวย สุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้ไคโตซาน

2)ด้านเส้นใยและสิ่งทอ

ไคตินและไคโตซานสามารถนำไปใช้ผลิตเป็นเส้นใยและเส้นด้าย ใช้เป็นสารตกแต่งสำเร็จสิ่งทอ (Textile finishing agent) นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีนำไคโตซานไปเคลือบลงบนเส้นใยหรือเส้นด้ายชนิดอื่น เช่น เติร์ยมเส้นด้ายฝ้ายที่เคลือบด้วยไคโตซาน (Chitosan coated cotton fiber, CCCF) นอกจากนี้ (Lim and Hudson, 2002) ยังได้พัฒนาสารตกแต่งเพื่อป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความว่องไวและสามารถสร้างพันธะที่แข็งแรงกับเส้นใย โดยการสังเคราะห์สาร NMA/GTMAC-Chitosan ซึ่งได้จากการนำไคโตซานมาทำปฏิกิริยากับ glycidyltrimethyl ammoniumchloride เพื่อให้ได้ GTMAC-Chitosan แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ N-methylolacrylamide เพื่อให้ได้สารที่ต้องการ โดยคาดว่าสารนี้จะสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับเซลลูโลสได้

3)ด้านอาหาร

จากสมบัติของไคโตซานในด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา นับเป็นจุดเด่นที่สำคัญต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการถนอมอาหาร เช่น ในการเก็บรักษาเนื้อปลา (Tsai et al., 2002) พบว่า ไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะมิโนสูงๆ เช่น 95-98% DD มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้จาก 5 วัน เป็น 9 วัน นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในเครื่องปรุงรสอาหาร เช่น ซิอิ้ว เป็นต้น ไคโตซานยังถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องสำอางค์หลายชนิด และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ จึงมีการผลิตเพื่อนำมาใช้เป็นฟิล์มห่อหุ้มเพื่อถนอมอาหาร

4) ด้านการบำบัดน้ำ

ไคโตซานมีประจุเป็นบวกและมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ผสม (heteropolymer) ของ D - glucosamine และ N-acetyl-glucosamine ซึ่งสามารถจับ คูลซับไขมัน และโลหะหนักต่างๆ ได้ เช่น สารหนู แคดเมียม ทองแดง ตะกั่วปรอท สังกะสี นิโคเกิล เป็นต้น (สุธา และคณะ, 2544) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพ (biofloculant) ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น (Selmer et al., 1996) พบว่า การนำเอาไคโตซานมาใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพร่วมกับ CMC เพื่อแยกโปรตีนและไขมันออกจากน้ำเสียของอุตสาหกรรมผลิตนมให้ผลดี คือนอกจากจะเป็นระบบการบำบัดด้วยสารจากธรรมชาติแล้ว ยังทำให้น้ำเสียสามารถนำไปบำบัดต่อได้ง่ายขึ้น ลดปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อปรับ pH และ sludge ที่ตกตะกอนแยกออกมาได้

นอกจากนี้เมื่อนำไคโตซานไปใช้เป็นสารตกตะกอนชีวภาพในบ่อเลี้ยงกุ้ง ยังพบว่าสามารถลดความขุ่น ปริมาณตะกอนแขวนลอย ตลอดจนค่า BOD และ COD ลงได้ ทำให้น้ำในบ่อมีคุณภาพดีขึ้นและส่งผลให้ได้ผลผลิตกุ้งปริมาณมากขึ้นและมีน้ำหนักรีดสูงขึ้น (Wanichpongpan และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ไคติน-ไคโตซานเป็นตัวจับไอออนโลหะในน้ำทิ้ง เช่น ไอออนของปรอท ทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม เป็นต้น (Felse and Panda, 1999)

5) ด้านเครื่องสำอาง

ไคโตซานเป็นสารประเภท non-toxic polyelectrolyte ที่มีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทั้งนี้ เพราะ ประจุบวกของหมู่แอมโมเนียม ($-NH_3^+$) ที่เรียงรายอยู่บนโครงสร้างของไคโตซานจะมีความว่องไวต่อการจับกับผิวหนังและเส้นผมที่ประกอบด้วยสาร mucopolysaccharides โปรตีน และไขมัน ที่มีประจุลบได้เป็นอย่างดี ไคโตซานที่เคลือบอยู่จะก่อตัวเป็นฟิล์มบางๆ พร้อมกับดูดซับความชื้นและไขมันเอาไว้ จึงช่วยรักษาความชุ่มชื้น และความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนังและเส้นผม และนอกเหนือจากสมบัติในการช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและลดอาการระคายเคืองหรือคันคันผิวหนังแล้ว อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีนของเส้นผมยังมีส่วนในการเพิ่มความเงางามให้แก่เส้นผมอีกด้วย (Dunn et al., 1997) ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารไคติน-ไคโตซาน ได้แก่ ครีม และโลชั่นบำรุงผิว แชมพู โลชั่นบำรุงผม แป้งแต่งหน้า ขาทาเล็บ ยาสีฟัน และมอยส์เจอร์ไรเซอร์ เป็นต้น

6) ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ไคติน-ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อและเซลล์ของร่างกาย สามารถรับประทานได้ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติโดยไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ให้ความสนใจกับการนำสารไคติน-ไคโตซานมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เช่น ใช้ในวัสดุทดแทนกระดูก ใช้ทางด้าน Tissue Engineering ใช้เป็นวัสดุปิดบาดแผล ใช้ทางด้านระบบนำส่งยา (drug delivery system) และ ใช้เป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเลือด (blood anticoagulant) และสารห้ามเลือด (hemostatic) เป็นต้น

4. การใช้ประโยชน์อนุภาคนาโนไคโตซาน

อนุภาคนาโนไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวกเตรียมได้จากไคโตซาน มีคุณสมบัติพิเศษ คือสามารถเข้ากันได้กับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย สามารถก่อตัวเป็นฟิล์ม รังแห (matrix) และเจล (ionotropic gel) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ ทำให้อนุภาคนาโนไคโตซานมีความเหมาะสมที่จะเตรียมเป็นอนุภาคและใช้เป็นตัวพา (carrier) ตัวยึดเกาะสารว่องไว (active molecules) ต่างๆ ไปยังอวัยวะเป้าหมาย (target organs) ใช้ได้กับสารชีวภาพชนิดต่างๆ เช่น วิตามิน โปรตีน ยา วัคซีน เป็นต้น ในช่วง

ทศวรรษที่ผ่านมาเทคโนโลยีนาโนมีการพัฒนาอย่างสูงเพื่อใช้ประโยชน์ ทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์ วิศวกรรม การแพทย์เภสัชกรรม และทางการเกษตร

ตัวอย่างการสร้างอนุภาคนาโนโคโคซาน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยา สารชีวเคมี สารเคมี และการแพทย์ เช่นการสร้าง immunosensor electrode โดยการตรึงแอนติบอดีบนพื้นผิว (Lei et al., 2003) การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานเพื่อช่วยเสริมสร้างการปลูกถ่ายเซลล์กระดูก โดยใช้ chitosan-hydroxyapatite (Hap) (Chen et al., 2004) และโดยใช้ chitosan-calcium phosphate cement (CPC) (Xu et al., 2007) การสร้าง horseradish peroxidase (HRP) electrode เพื่อใช้ในการตรวจวัด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการตรึง HRP ในอนุภาคนาโน chitosan-scaled particulate gold (nano-Au) (Nie and Wang, 2007) การสร้างอนุภาคนาโน chitosan-viral vaccine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและการนำพาเข้าสู่เซลล์ ด้วยการฉีดพ่นเข้าจมูก (Borges et al., 2006; Amidi et al., 2007) และด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Zhou et al., 2007) การสร้างอนุภาคโคโคซาน-hydroxyl apatite (HAp) เพื่อนำพาชิ้น DNA (DNA delivery) เข้าสู่เซลล์กระดูกเป้าหมาย (Nie and Wang, 2007) การตรึงเอนไซม์ไลเปสในสภาพ chitosan-lipase nanoparticle เพื่อใช้ในการผลิต glycerol และ fatty acid ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Tang et al., 2007)

5. การใช้อนุภาคนาโนโคโคซานในสัตว์น้ำ

การป้องกันและรักษาโรคในกุ้งเป็นปัญหาสำคัญที่ยังไม่สามารถจัดการได้อย่างเด็ดขาด การใช้สารเสริมอาหาร วิตามิน สารสกัดต่างๆ ในกุ้ง ต้องใช้วิธีผสมอาหารให้กุ้งกิน สารชีวโมเลกุลเหล่านี้มักเป็นสารชีวโมเลกุลที่ถูกทำลายได้ง่ายจากออกซิเจนในอากาศและในน้ำ และยังมีโอกาสละลายออกจากอาหารเมื่อสูญเสียไปในน้ำ ทำให้ปริมาณและคุณภาพไม่คงที่ ไม่แน่นอนต้องแก้ไขโดยการเพิ่มปริมาณผสมให้มากขึ้นอย่างน้อย 2 เท่าเพื่อให้สำหรับการสูญเสียดังกล่าว ทำให้เกิดการสูญเสียซ้ำซ้อนในการใช้สารชีวภาพซึ่งมีราคาแพงในปริมาณเพิ่มขึ้น เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น และสำหรับสารที่ต้องนำเข้า ก็ต้องเสียค่าใช้จ่ายนี้เพิ่มขึ้น

การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนโคโคซานในด้านประมงยังมีรายงานน้อยมาก ได้แก่

การสร้าง chitosan-alginate microcapsule เพื่อนำพา *Vibrio* vaccine โดยการผสมอาหารกิน (Polk et al., 1994)

การเตรียมอนุภาคนาโน chitosan-plasmid DNA เพื่อใช้ในการนำพา DNA vaccine เข้าร่างกายปลา rainbow trout โดยการแช่ในความเข้มข้น 5 - 15 ug/ml (Romøren et al., 2002)

การเตรียมเซลล์ microcapsule ของไมโครอัลจี *Haematococcus pluvaelis* เคลือบโคโคซาน เพื่อรักษารังควัตถุแดง astaxanthin ได้นานถึง 24 สัปดาห์ (Kittikaiwan et al., 2007)

การสร้างและนำอนุภาคนาโนโคโคซาน-pVP28 ให้กุ้งกุลาดำกิน พบว่า กุ้งสามารถสร้างการต่อต้านเชื้อไวรัสสำคัญ WSSV ได้ดี (Rajeshkumar et al., 2009)

จะเห็นได้ว่า เทคโนโลยีของอนุภาคนาโนโคโคซานกำลังถูกพัฒนาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่การศึกษาวิจัยด้านการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อยมาก และยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยในระดับอนุภาคนาโนชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย ทั้งที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ เป็นแหล่งผลิตโปรตีนคุณภาพสูงที่มีราคาไม่แพง เช่น ปลา น้ำจืดชนิดต่างๆ และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้เข้าประเทศสูง โดยเฉพาะการส่งออกกุ้งทะเลที่มีมูลค่าปีละไม่น้อยกว่า 6 หมื่นล้านบาทตั้งแต่ปี 2545 นอกจากนี้ความต้องการบริโภคกุ้งก้ามกรามของต่างประเทศก็มีเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเช่นกัน

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน

1.1 การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

ใช้ไคโตซาน ที่ % DD = 80-95 และ MW = 50,000 – 200,000KDa โดยแปรผันความเข้มข้นที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % ดังนี้ (1) วิธี ionotrophic gelation โดยใช้ crosslinker แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ glutaraldehyde (GA) ที่ 0.4 % โดยแปรผันความเร็วการกวนที่ 150, 500, 700 และ 1,000 rpm และ sodium tripolyphosphate (TPP) ที่ความเข้มข้นของ 1.0 mg/ml และ (2)วิธีmicroemulsion method โดยใช้ TPPที่ความเข้มข้นของ 0.5mg/ml

ในการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธี microemulsion method ทำโดยการตีปั่นเฟสน้ำมันและเฟสน้ำ โดยใช้เครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (homoginizer) ที่ความเร็วรอบ 16,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นค่อยๆหยดสารละลาย TPP เข้มข้น 0.5 %w/v (40 ml) แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนหรืออนุภาคที่ก่อตัวขึ้นออกจากส่วนที่เป็นของเหลว ถ้างอกด้วยสารละลายสารลดแรงดึงผิว tween 60 เข้มข้น 0.1 %และ น้ำกลั่น สลับกับการปั่นเหวี่ยง เพื่อกำจัดน้ำมันจากนั้นล้างด้วยอะซิโตน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แบ่งอนุภาคเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C อีกส่วนหนึ่งนำไปทำแห้งในระบบสุญญากาศ แล้วเก็บในโถสุญญากาศที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอวิเคราะห์/ตรวจสอบต่อไป

สำหรับการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธี ionic gelation ทำโดยหยด cross-linker 50 ml ลงในสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติก 3 % ปริมาตร 100 ml ผ่านทาง syringe ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที โดยจะเกิดเป็นคอลลอยด์ที่มีลักษณะสีขาวขุ่นเกิดขึ้นจากนั้นนำสารแขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาคนาโนไคโตซานออก โดยปั่นที่ 20,000 x g ด้วยอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

1.2 การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซาน - สารสกัดสมุนไพร

ทำเช่นเดียวกับการสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่า แต่ผสมสารสกัดสมุนไพรในสารละลายโคโคซานโดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

2. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนโคโคซาน

2.1 Scan electron microscope (SEM)

นำสารเจลอนาโนโคโคซานมากระจายตัวในน้ำ โดยใช้เครื่อง vortex จากนั้นหยดของเหลวดังกล่าว บนกระจกปิดสไลด์ซึ่งวางบนสตัปที่ยึดกันด้วยเทปคาร์บอนสองหน้า ทำแห้งในระบบสุญญากาศเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำไปตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด [JEOL รุ่น JEM LV 5600]

2.2 Transmission electron microscope (TEM)

ทำได้โดยนำ copper grid ไปแตะบนหยดของเหลว สารตัวอย่างจะกระจายตัวในน้ำ จากนั้นซับสารตัวอย่างที่มากเกินไปออกจากกริดโดยใช้กระดาษกรอง ทำแห้งในระบบสุญญากาศเป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำไปตรวจสอบโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [JEOL รุ่น JEM - 1220]

2.3 Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)

นำเจลอนาโนโคโคซานมาทำแห้งด้วยระบบ freeze dry จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี ด้วยเครื่อง FT IR [ThermoNicolate Nexus 670]

2.4 การวัดขนาดของอนุภาคนาโนโคโคซาน

นำเจลอนาโนโคโคซานมาทำแห้งด้วยระบบ freeze dry จากนั้นนำไปตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี ด้วยเครื่อง nanosizer

3. การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

3.1 การเตรียม stock standard tannic solution

- เตรียมแทนนิน 10.0 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml
- เตรียมสารละลายแทนนินให้ได้ความเข้มข้น 50, 40, 30, 20, 10, and 5 g แล้วใส่ Folin–Ciocalteu's reagent
- ใช้ volumetric flask ปรับปริมาตรเป็น 10 ml ด้วย 33% Na₂CO₃, 10H₂O แล้วกรอง
- ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ A = 720 nm โดยเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ใส่สารละลาย

3.2 การหาปริมาณโพลีฟีนอลและแทนนิน

- solution1 (S1) เตรียมจาก BSS (basic sample solution, BSS) 2ml ผสมกับน้ำ 8ml และ acetate buffer 10 ml
- solution 2 (S2) เตรียมโดยนำ S1 10 ml ผสมกับ casein 50 mg เขย่าเป็นเวลา 45 min เพื่อให้มีการดูดซับแทนนิน แล้วกรอง (adsorption of tannins)
- S1 1 ml ผสมกับ FCR 0.5 ml ปรับปริมาตรเป็น 10ml ด้วย 33% Na₂CO₃, 10H₂
- ทำเช่นเดียวกันแต่ใช้สาร S2
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A = 720 nm โดยเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ใส่สารละลาย

4. การศึกษาประสิทธิภาพการบรรจุ

นำโคโคซานอนุภาคนาโนที่มีสารชีวภาพบรรจุอยู่มาทำการปั่นแยกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 x g ด้วยอุณหภูมิต่ำ 4°C เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสเก็บไว้ นำน้ำส่วนใสสารละลายชีวภาพเริ่มต้นและน้ำส่วนใส ไปทำการหาค่าแทนนินแล้วนำค่าที่ได้มาทำการคำนวณเพื่อค่าประสิทธิภาพการบรรจุ (encapsulation efficiency, %EE) จากสมการข้างล่างดังนี้

$$\% \text{ encapsulation efficiency (\%EE)} = (A-B) / A \times 100$$

A, ความเข้มข้นของสารชีวภาพก่อนการบรรจุ

B, ความเข้มข้นของสารชีวภาพในส่วนใสหลังการบรรจุ

5. การศึกษาการปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในหลอดทดลอง

การหาค่าการปลดปล่อยสารชีวภาพจากอนุภาคนาโนโคโคซาน (releasing efficiency) ทำโดยนำเจลอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารชีวภาพ มาทำให้แห้งด้วยระบบ freeze dry จากนั้นนำผงอนุภาคนาโนโคโคซาน 1 mg ใส่ในถุง dialysis bag ที่มีรูพรุนขนาด 20,000 KDa นำถุงผูกกับแท่งแก้ว และแช่ในบัฟเฟอร์ ทำการกวนน้ำ แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ชั่วโมง นำน้ำบัฟเฟอร์ที่คาดว่าจะมีสารชีวภาพละลายอยู่ไปตรวจหาปริมาณแทนนิน

6. การศึกษาการปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในสัตว์น้ำ

6.1 การปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในกุ้ง

ได้ใช้กุ้งก้ามกราม เป็นตัวแทนกุ้งทดลอง โดยใช้กุ้งก้ามกรามวัยรุ่น ขนาด น้ำหนักเฉลี่ย 150 กรัม

ทำการให้อาหารเคลือบอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (GFP) และตัดลำไส้ ที่เวลาต่างๆ หลังการให้อาหาร แล้วนำไปส่องดูการย่อยสลายอนุภาคนาโนโคโคซานด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ บันทึกผลจากภาพถ่าย โดยติดตามการเรืองแสงของโปรตีน GFP

6.2 การปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในปลา

ได้ใช้ปลานิล เป็นตัวแทนปลาทดลอง โดยใช้ลูกปลานิล ที่มีขนาด ความยาวเฉลี่ย 15 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 150 กรัมและดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม

7. การศึกษาประสิทธิภาพการนำส่งสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซาน

ใช้ลูกปลานิล ขนาดความยาวเฉลี่ย 15 ซม.และน้ำหนักเฉลี่ย 150 กรัม จำนวน 30 ตัว ต่อ 1 กลุ่ม และใช้เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (AH) เป็นเชื้อโรคทดสอบ แล้วติดตามผลการรักษาเป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่ม Normal no AH เป็นกลุ่มควบคุม ลูกปลานิลปกติ ไม่ฉีดเชื้อ AH

กลุ่ม AH + CS-MPX เป็นกลุ่มลูกปลานิลได้รับเชื้อ AH ที่ปริมาณเชื้อ 1×10^5 1×10^6 และ 1×10^7 cfu/ 1 ตัวปลา และให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดสมุนไพร 0.1% หลังฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง

กลุ่ม AH + MPX เป็นกลุ่มลูกปลานิลได้รับเชื้อ AH ที่ปริมาณเชื้อ 1×10^5 1×10^6 และ 1×10^7 cfu/ 1 ตัวปลา และให้อาหารผสมสารสกัดสมุนไพร 0.1% หลังฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง

กลุ่ม AH no treat เป็นกลุ่มลูกปลานิลได้รับเชื้อ AH ที่ปริมาณเชื้อ 1×10^5 1×10^6 และ 1×10^7 cfu/ 1 ตัวปลา และให้อาหารปกติหลังฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง

ผลการวิจัย อภิปราย และวิจารณ์

1. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน

ได้จัดเตรียมไคโตซานจากการซื้อผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยได้นำมาตรวจ สอบคุณภาพด้วยการส่งตรวจค่าความบริสุทธิ์โดยหาค่าร้อยละระดับขั้นของดีอะเซทิลเลชัน (% degree of deacetylation, %DD) และขนาดของโมเลกุลไคโตซาน(MW) ได้ผลดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าคุณภาพที่ตรวจได้ไม่ตรงกับที่ระบุไว้ในสลากของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้อือเอาค่าที่ตรวจได้เป็นค่าจริงสำหรับการทดลอง

ตารางที่ 1 ความบริสุทธิ์ (%DD) และขนาดของโมเลกุลไคโตซาน (MW)

Brand	specified %DD	measured %DD	specified MW (kDa)	measured MW (Da)
1	95	77.09	50	1,519,039
2	95	ไม่ละลาย	200	182,687*
3	90	91.62	150	375,134
4	85	87.31	80	252,995
5	96.85	81.45	ไม่ระบุ	139,265
6	80-85	82.95	50-80	385,269

ได้เตรียมอนุภาคนาโนไคโตซาน-TPP(CS-TPP)ด้วยวิธี ionic gelation ที่ความเข้มข้นของไคโตซาน สังเกตเห็นว่าสารละลายที่ได้ใสขึ้นแบบเจล (ภาพที่ 4)

ดังนั้น การวิจัยนี้ใช้ไคโตซาน ที่ % DD = 81.45 - 91.62 และ MW = 139– 1,500 kDa แปรผันความเข้มข้นที่ 0.2 และ 0.5% (w/v) ทำการสร้างพันธะด้วยวิธี microemulsion และ ionotrophic gelation โดยใช้ sodium tripolyphosphate (TPP) เป็น crosslinker ที่ความเข้มข้นของ 0.5 และ 1.0 mg/ml ตามลำดับทำการแปรผันความเร็วการกวนที่ 150, 500, 700 และ 1,000 rpm



microemulsion



ionic gelation

ภาพที่ 4 เจลของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าด้วยวิธีไมโครอิมัลชันและไอออนิกเจลชัน

1.1 อนุภาคนาโนไคโตซาน-ไตรโพลีฟอสเฟต ด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน

ทำการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-ไตรโพลีฟอสเฟต (CS-TPP) ด้วยวิธี micro-emulsion โดยการเติมสารลดแรงตึงผิว และใช้ไคโตซาน 95 %DD ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 % (w/v) จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว

เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้อง SEM พบว่า ที่การใช้ไคโตซานเข้มข้น 0.5 และ 1.0 % (w/v) ยังเห็นผลึกของไคโตซานที่ไม่เป็นอนุภาค ส่วนที่ความเข้มข้น 1.5 % (w/v) เห็นอนุภาคนาโนไคโตซานมีรูปร่างค่อนข้างกลม การเกาะกลุ่มกันมาก และขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน ใช้ไคโตซาน 95 % ที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v)

ได้เปรียบเทียบการใช้ไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 1.5% (w/v) ที่ 2 ขนาดโมเลกุล คือ 20 และ 290 kDa ในการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน และใช้สารลดแรงตึงผิวซึ่งจากการทดลองครั้งก่อน พบว่า อนุภาคนาโนไคโตซานแห้งมีการเกาะกันเป็นก้อน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้นำอนุภาคนาโนไคโตซานที่ได้ไปทำการ sonicate โดยแปรผันระยะเวลาต่างๆ กัน ที่ 40 50 และ 60 นาที

0.5 %(w/v)

1.0 %(w/v)

1.5 %(w/v)



ภาพที่ 5 SEM micrographs ของอนุภาคไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชันที่ไคโตซานความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพถ่าย SEM พบว่า ความแตกต่างของขนาดอนุภาคยังไม่ชัดเจน และยังมีการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ซึ่งเมื่อใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 20 kDa จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีขนาดอยู่ในช่วง 200-400nm(ภาพที่4) ส่วนไคโตซานน้ำหนักโมเลกุล 290 kDa จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีขนาดอยู่ในช่วง 500-1000 nm (ภาพที่ 9)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสำหรับการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานโดยใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลเล็กจะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีขนาดเล็กกว่า

1.2 อนุภาคนาโนไคโตซาน-ไตรโพลิฟอสเฟต โดยวิธีไอออนิกเจลเลชัน

จากการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชัน โดยใช้ไคโตซานซึ่งมีค่าร้อยละขั้นขึ้นของดีอะเซทิลเลชัน (% degree of deacetylation, DD) ที่ 85, 90 และ 95 ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5% (w/v)

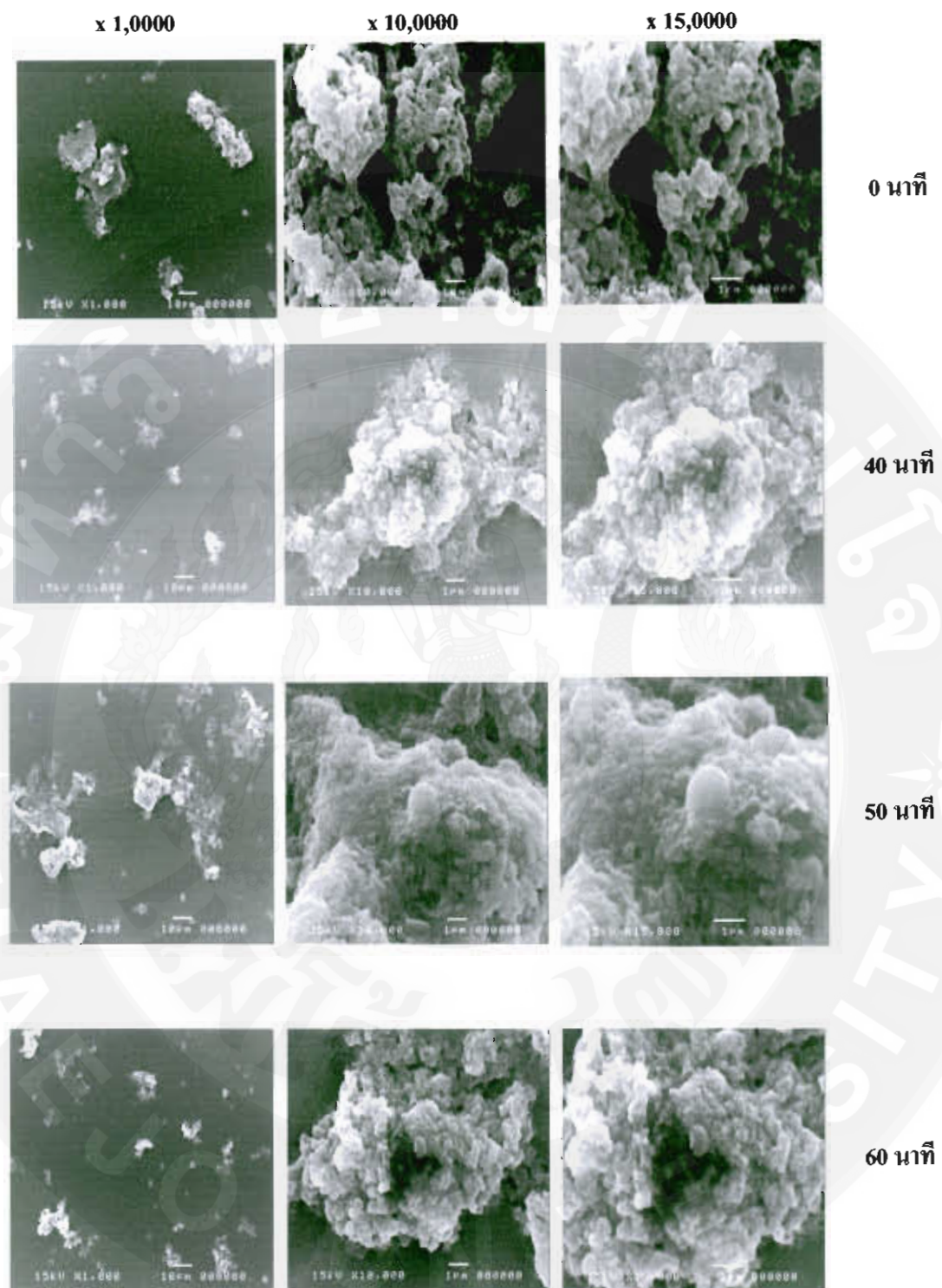
พบว่าการใช้ไคโตซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 KDa ความเข้มข้น 0.5% w/v จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีลักษณะเป็นเจลใสและเมื่อนำตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้อง SEM พบว่าได้อนุภาคนาโนไคโตซานมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีการเกาะกลุ่มกันมากและขนาดอนุภาคมีขนาดเล็ก และเมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย TEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะกลม และมี

ขนาดในระดับนาโนเมตร ขนาดประมาณ 50-70 nm ในขณะที่อนุภาคนาโนไคโตซานห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรมีขนาดประมาณ 50-100 nm ซึ่งใหญ่กว่าอนุภาคนาโนไคโตซานเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนไคโตซาน

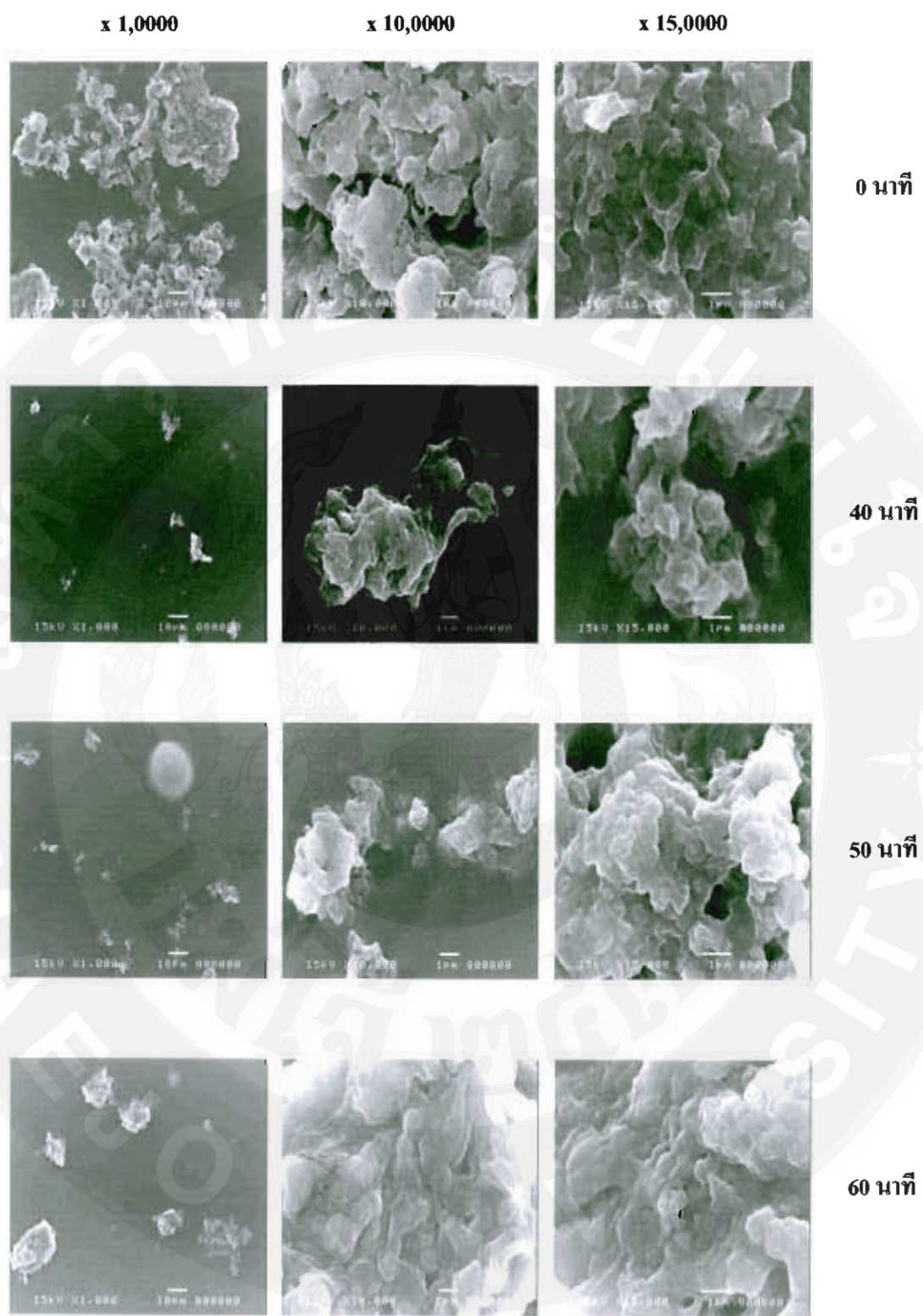
ส่วนการใช้ไคโตซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa และ 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 85 %DD ซึ่งอาจเกิดจากผลของน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ตามไปด้วย ส่วนผลของความเข้มข้นของไคโตซานนั้นมีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะทำให้ได้อนุภาคที่ใหญ่ขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากมีความหนืดของสารละลายไคโตซานมากเกินไป แต่ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้ความเข้มข้นของไคโตซานที่ 0.5% w/v เนื่องจากจะทำให้ได้สัดส่วนสำหรับการทำปฏิกิริยาที่พอดีกับสาร cross linked ก็คือ โซเดียมไทรโพลีฟอสเฟต (TPP 1 mg/ml) (มานี และคณะ, 2548)

จากผลการทดลองสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า พบว่า การสร้างอนุภาคนาโนด้วยวิธีไมโครอิมัลชันให้อนุภาคนาโนที่เป็นผงได้ง่ายกว่าวิธีไอโอโนโทรปีกลีชัน แต่วิธีไมโครอิมัลชันมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่า และยังต้องมีขั้นตอนการกำจัดน้ำมันโดยใช้เอซีโตน ซึ่งมีโอกาสตกค้างในอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

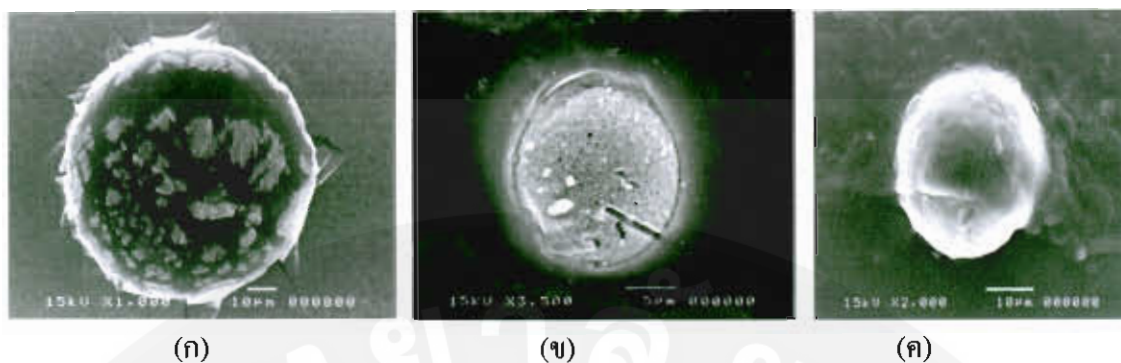
ดังนั้น เทคนิคไอโอโนโทรปีกลีชันเป็นวิธีการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานที่เหมาะสมในงานวิจัย โดยการใช้ไคโตซาน 96.85 %DD (วัดได้ 81.45 %DD) ขนาดโมเลกุลที่วัดได้ 139kDa และใช้ TPP 1 mg/ml ในอัตราส่วนปริมาตร 2 : 1 ความเข้มข้นที่เหมาะสม เท่ากับ 0.2 % จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีขนาดเล็กที่สุด 183.50 nm ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นและอัตราส่วนนี้ เพื่อการบรรจุสารชีวภาพ



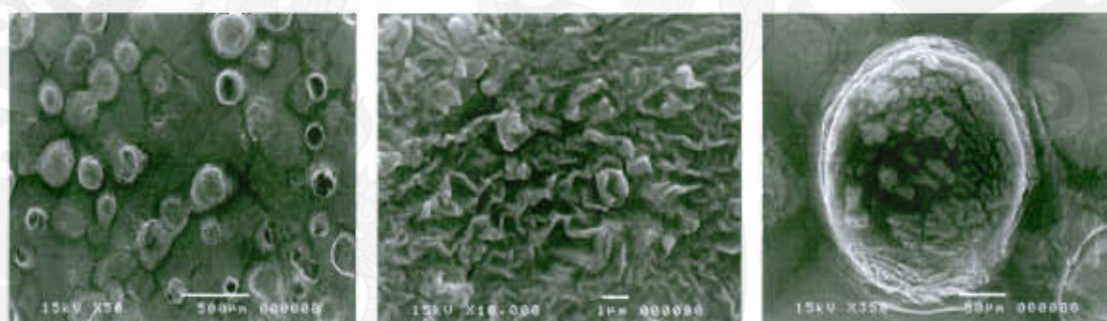
ภาพที่ 6 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 7 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 290 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 8 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) โดยเติม glucose 5 % (ก และ ข) และ trehalose 1 % (ค)



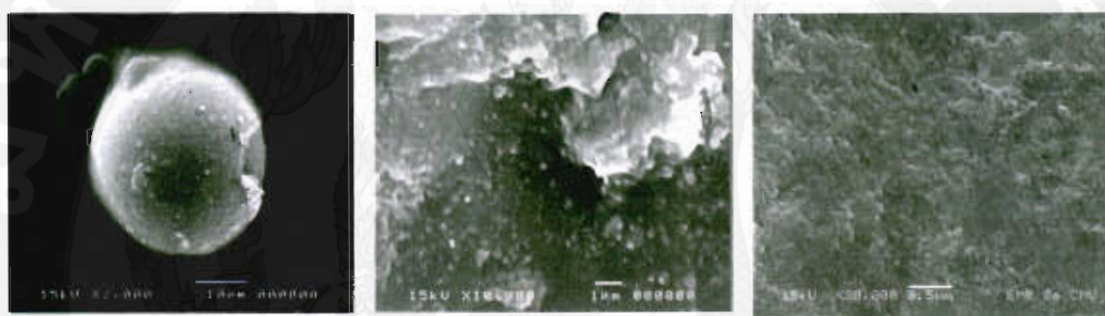
ภาพที่ 9 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%



ภาพที่ 10 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



ภาพที่ 11 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 200 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



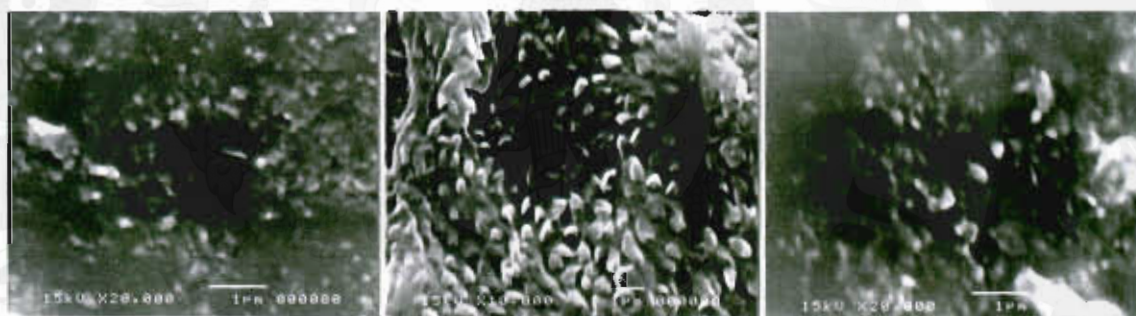
ภาพที่ 12 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%



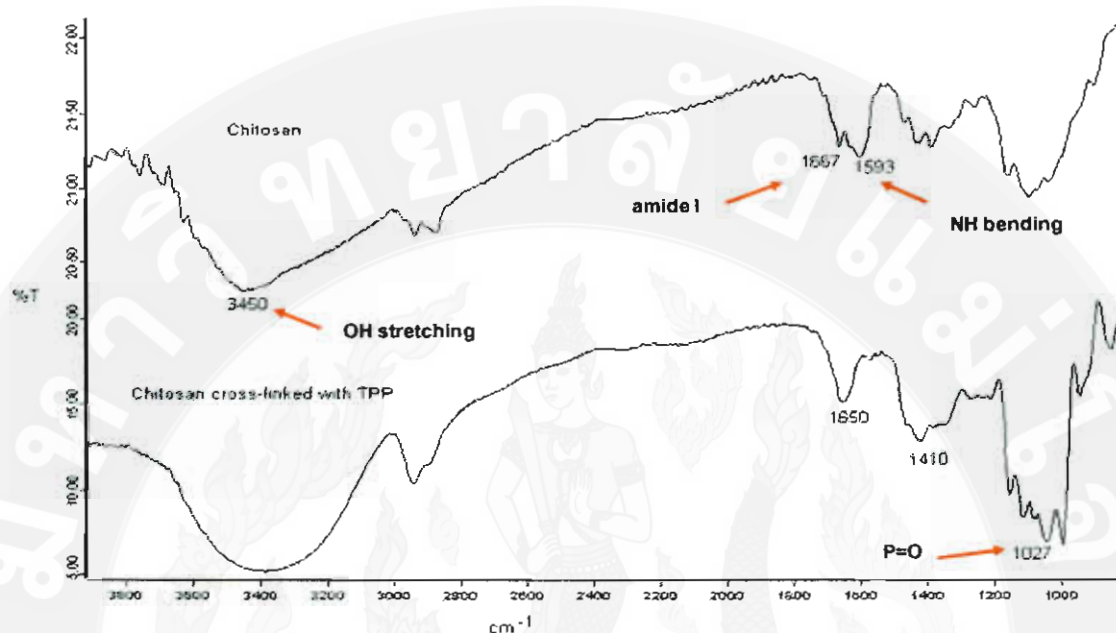
ภาพที่ 13 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้โคโคซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



ภาพที่ 14 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%



ภาพที่ 15 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



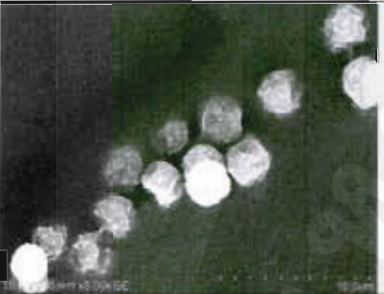
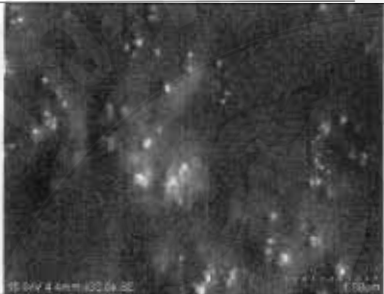
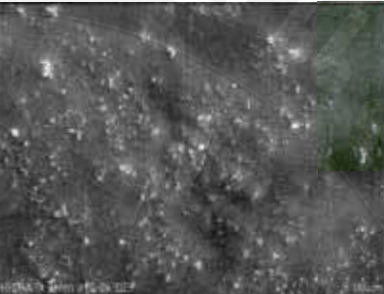
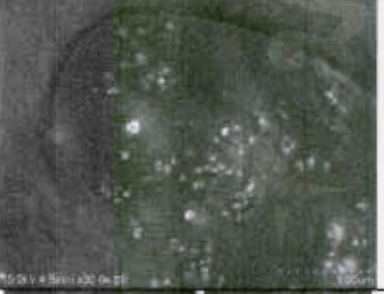
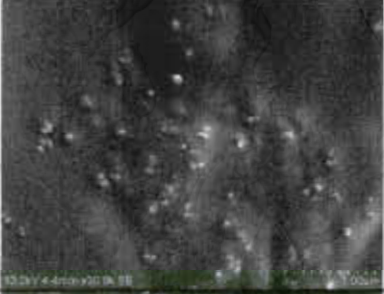
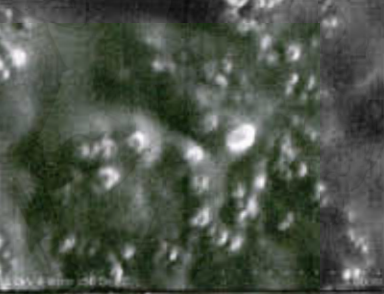
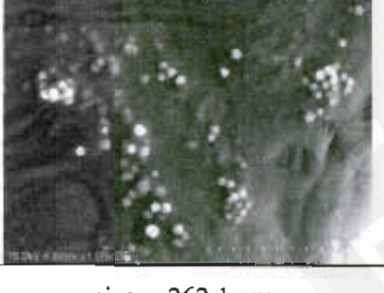
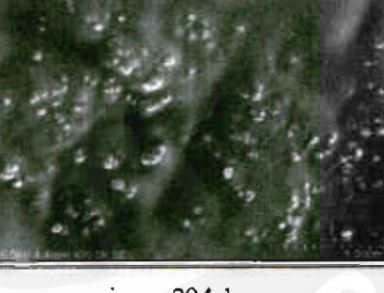
ภาพที่ 16 FTIR spectra ของไคโตซานและอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

ในการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานเพื่อใช้ในกึ่ง ได้ทำการขยายปริมาณการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน โดยใช้ไคโตซาน CS 96.85 %DD (วัดได้ 81.45 %DD) ที่ความเข้มข้น 0.2% (ภาพที่ 17) พบว่า ไม่มีความแตกต่างในการใช้ความเร็วรอบในการกวนระหว่าง 900 – 1,300 rpm ดังนั้นในการเตรียมอนุภาคนาโนไคโตซานในปริมาณมากจึงสามารถเพิ่มความเร็วรอบในการกวนได้เป็น 1,300 rpm

ตารางที่ 2 สรุปขนาดของอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าที่เตรียมได้

Brand	specified %DD	measured %DD	specified MW (kDa)	measured MW (Da)	%CS	SEM size	TEM size	Nanosizer (nm)	
								Average	S.D.
1	95	77.09	50	1,519,039	0.2	150-300 um	-	443.00	123.63
1	95	77.09	50	1,519,039	0.5	5-300 um	-	549.90	39.68
2	95	ไม่ละลาย	200	182,687*	0.2	10-100 um	-	342.17	35.52
2	95	ไม่ละลาย	200	182,687*	0.5	1-10 um	-	831.60	197.22
3	90	91.62	150	375,134	0.2	0.1-20 um	100 nm	211.33	10.90
3	90	91.62	150	375,134	0.5	0.1-20 um	-	299.93	64.84
4	85	87.31	80	252,995	0.2	5-20 um	-	242.70	26.80
4	85	87.31	80	252,995	0.5	100-1,000 nm	20-500 nm	517.83	111.47
5	96.85	81.45	ไม่ระบุ	139,265	0.2	150-250 nm	-	183.50	8.23
5	96.85	81.45	ไม่ระบุ	139,265	0.5	-	10-200 nm	262.17	5.01
6	80-85	82.95	50-80	385,269	0.2	-	-	254.33	16.46
6	80-85	82.95	50-80	385,269	0.5	-	50-300 nm	303.87	56.53

* ตรวจเฉพาะส่วนที่ละลายได้

900rpm (150ml)	900 rpm	1,100 rpm	1,300 rpm
			
			
			
size = 262.1 nm	size = 262.4 nm	size = 294.1 nm	size = 304.9 nm

ภาพที่ 17 ลักษณะของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าที่การผันแปรความเร็วรอบในการปั่น ที่ปริมาตร 1,500ml

2. อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร

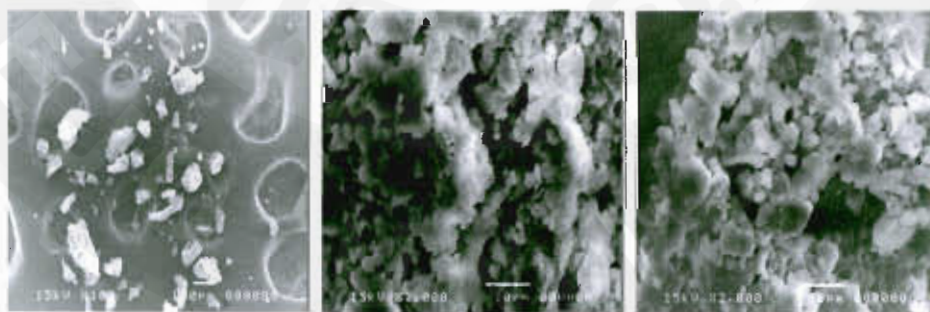
2.1 ประสิทธิภาพการบรรจุ

2.1.1 การเตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน

ทำการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ทำการ sonicate 60 นาที เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย SEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ขนาดไม่สม่ำเสมอ มีการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน อาจเนื่องมาจากสารสกัดสมุนไพรเข้าไปอยู่ในอนุภาคนาโนไคโตซาน อนุภาคนาโนไคโตซาน - สารสกัดสมุนไพรที่เห็นมีขนาดอยู่ในช่วง 1-10 μm (ภาพที่ 18)

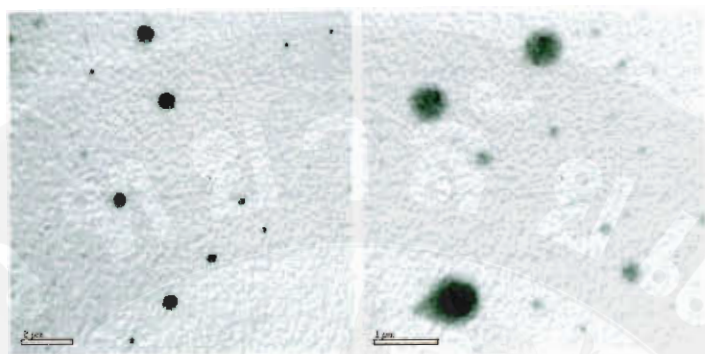
เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย TEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะกลม และมีขนาดในระดับนาโนเมตร ขนาดประมาณ 160-860 nm ในขณะที่อนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรมีขนาดประมาณ 220-880 nm (ภาพที่ 19) ซึ่งใหญ่กว่าอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนไคโตซาน

นำอนุภาคนาโนไคโตซานที่ได้ไปพิสูจน์การบรรจุสาร โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่ามีการบรรจุสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนไคโตซานจริง (ภาพที่ 20)

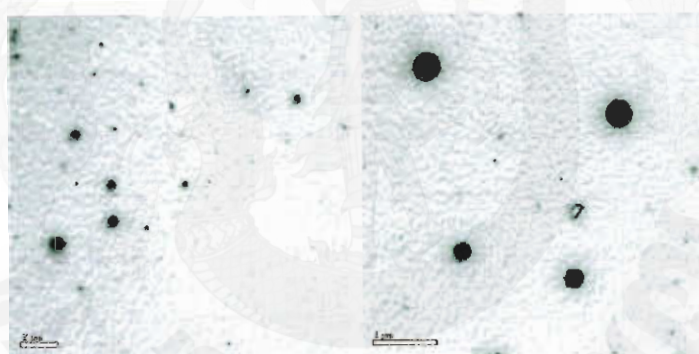


ภาพที่ 18 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ไคโตซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate 60 นาที

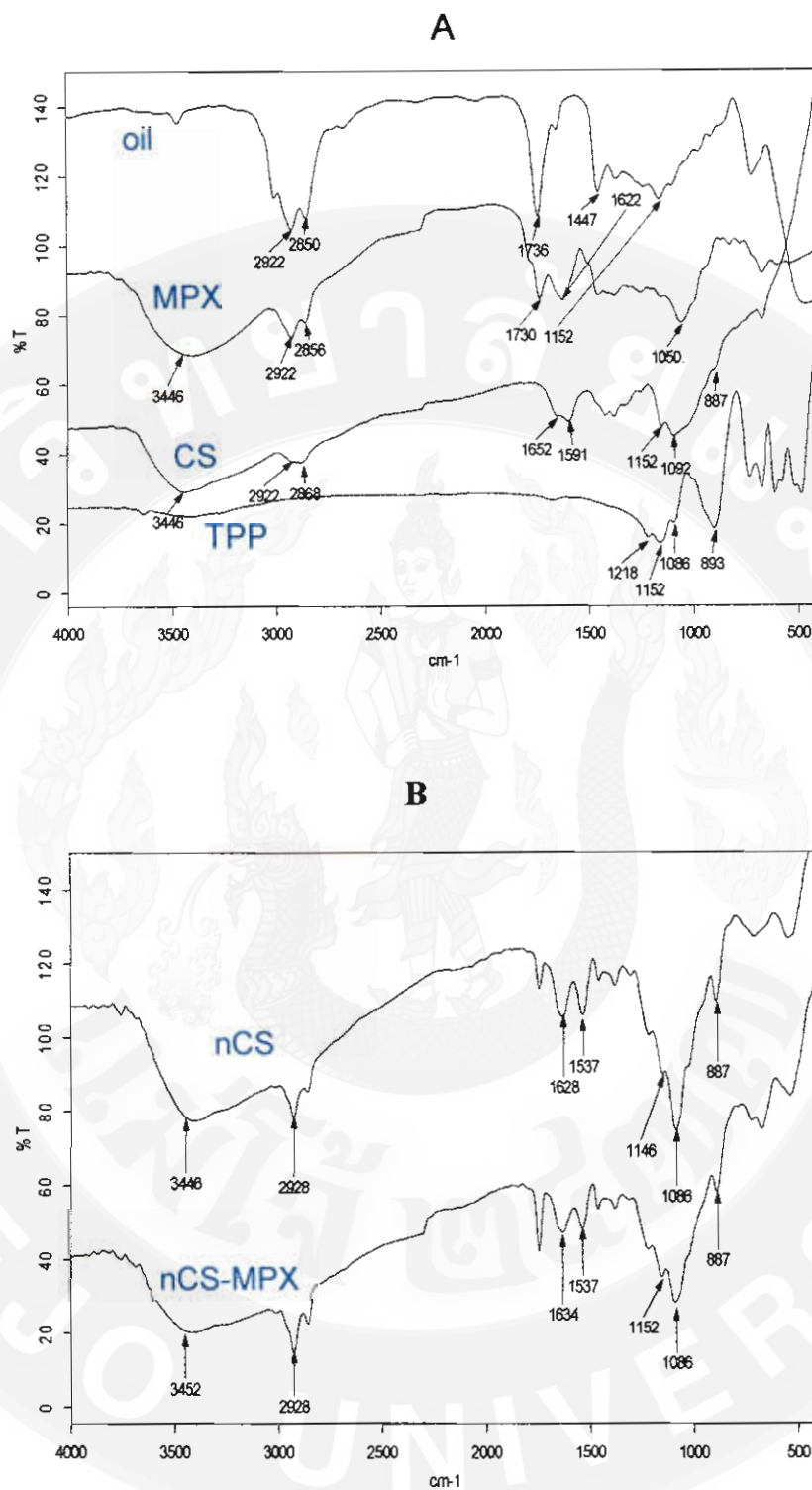
อนุภาคนาโนโคโคซานเปล่า



อนุภาคนาโนโคโคซาน – สารสกัดใบหูกวาง



ภาพที่ 19 TEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมโดยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้โคโคซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate 60 นาที (bar = 1 μ m)



ภาพที่ 20 FTIR spectra ของสารต่างๆและอนุภาคนาโนไคโตซานที่สร้างด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน

oil = น้ำมันพืช

MPX = magosteen peel extract

CS = ไคโตซาน

TPP = tripolyphosphate

nCS = nanochitosan

nCS-MPX = nanochitosan encapsulating MPX

2.1.2 การเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน

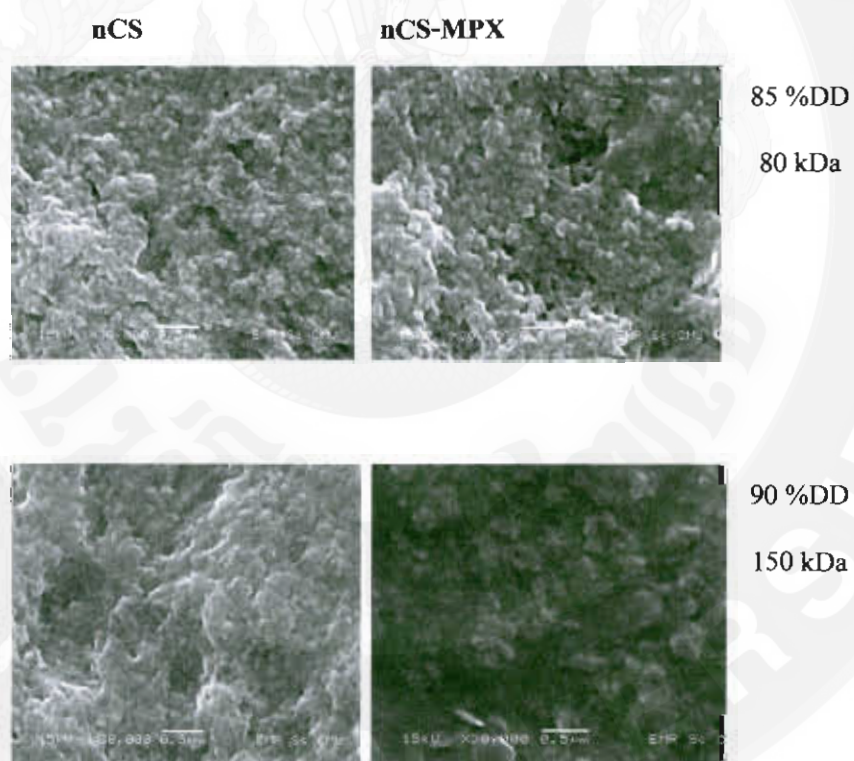
ได้ทำการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี ionic gelation และนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค SEM และ TEM จากภาพ electron-micrographs คาดว่าอนุภาคนาโนไคโตซานสามารถบรรจุสารสกัดสมุนไพรได้แต่ขนาดของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าและบรรจุสารสกัด ไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 3 ขนาดของอนุภาคนาโนไคโตซานที่วัดด้วยวิธีnanosizerโดยใช้ไคโตซาน 96.85 %DD ที่ความเข้มข้น 0.2 % บรรจุด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารสกัด (%)	ขนาด อนุภาคนาโน (nm)
0	204.4
0.1	280.4
0.5	925.1
1.0	1303.6
2.0	2442.6



ภาพที่ 21 เจลของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าและบรรจุสารสกัดสมุนไพร

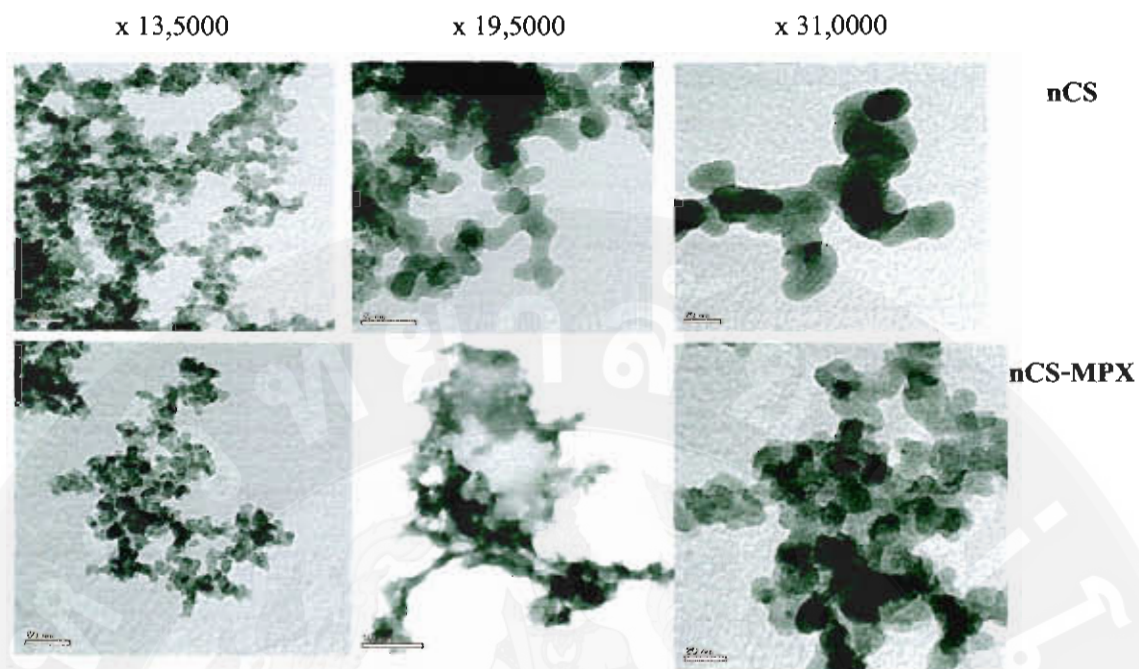


ภาพที่ 22 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลเลชัน โดยใช้

ไคโตซาน ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และเติม trehalose 1%

nCS = อนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

nCS-MPX = อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร



ภาพที่ 23 TEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีโฮออนิกเจลชันโดยใช้ไคโตซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และเติม trehalose 1%

nCS = อนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

nCS-MPX = อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร

2.2 ประสิทธิภาพการบรรจุ(encapsulation efficiency)

จากการทดสอบบรรจุสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนไคโตซานด้วยวิธีไอออนิกเจเลชัน พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) มี โดยมีค่าการบรรจุ เท่ากับ 70.53, 71.42, 72.47, 76.81 และ 68.41 % ตามลำดับ ประสิทธิภาพการบรรจุในช่วงการเพิ่ม จากความเข้มข้น 0.1 – 1.5 % แต่ลดลงที่ความเข้มข้น 2.0 % แสดงว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการบรรจุ คือ ความเข้มข้น 1.5 % และให้ค่าประสิทธิภาพการบรรจุสูงสุด 76.81%

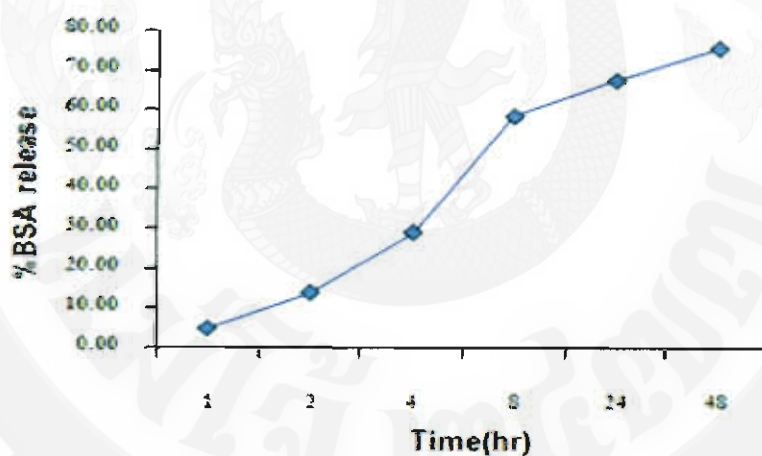
ตารางที่ 4อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้

สารชีวภาพ	size by nanosizer (nm)	% EE
CS – MPX		
- 0.0 % (w/v)	204.40±18.98	
- 0.1 % (w/v)	280.43±20.64	70.53
- 0.5 % (w/v)	925.13±50.81	71.42
- 1.0 % (w/v)	1303.67±248.92	72.47
- 1.5 % (w/v)	2442.67±346.09	76.81
- 2.0 % (w/v)	2851.33±518.30	68.41

2.3 ประสิทธิภาพการปลดปล่อยในหลอดทดลอง(In vitro releasing efficiency)

ได้ทดสอบบรรจุโปรตีน BSA โดยเลือกที่ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร 1.5 % (w/v) ซึ่งได้ค่าประสิทธิภาพการบรรจุสูงสุด พบว่า ที่สภาวะ pH = 7.0 สารสกัดสมุนไพรเริ่มถูกปลดปล่อยตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมง โดยมีค่าการปลดปล่อยสูงสุดที่ 75.03 %

ได้ทำการทดสอบย่อยอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีน BSA ด้วยเอนไซม์โคโคซานเนส พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยอนุภาคนาโนโคโคซานได้ทั้งหมด และปลดปล่อยโปรตีนได้ 100 % ดังนั้น สามารถคาดได้ว่าในลำไส้สัตว์น้ำโดยเฉพาะในกุ้ง มีเอนไซม์โคโคซานเนส ทำให้อนุภาคนาโนโคโคซานจะถูกย่อยได้ทั้งหมด และสารชีวภาพจะถูกปลดปล่อยเพื่อนำไปใช้ได้



ภาพที่ 24 การปลดปล่อยสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซานในหลอดทดลอง

3. ประสิทธิภาพการย่อยอนุภาคนาโนในโคโคซานลำไส้สัตว์น้ำ

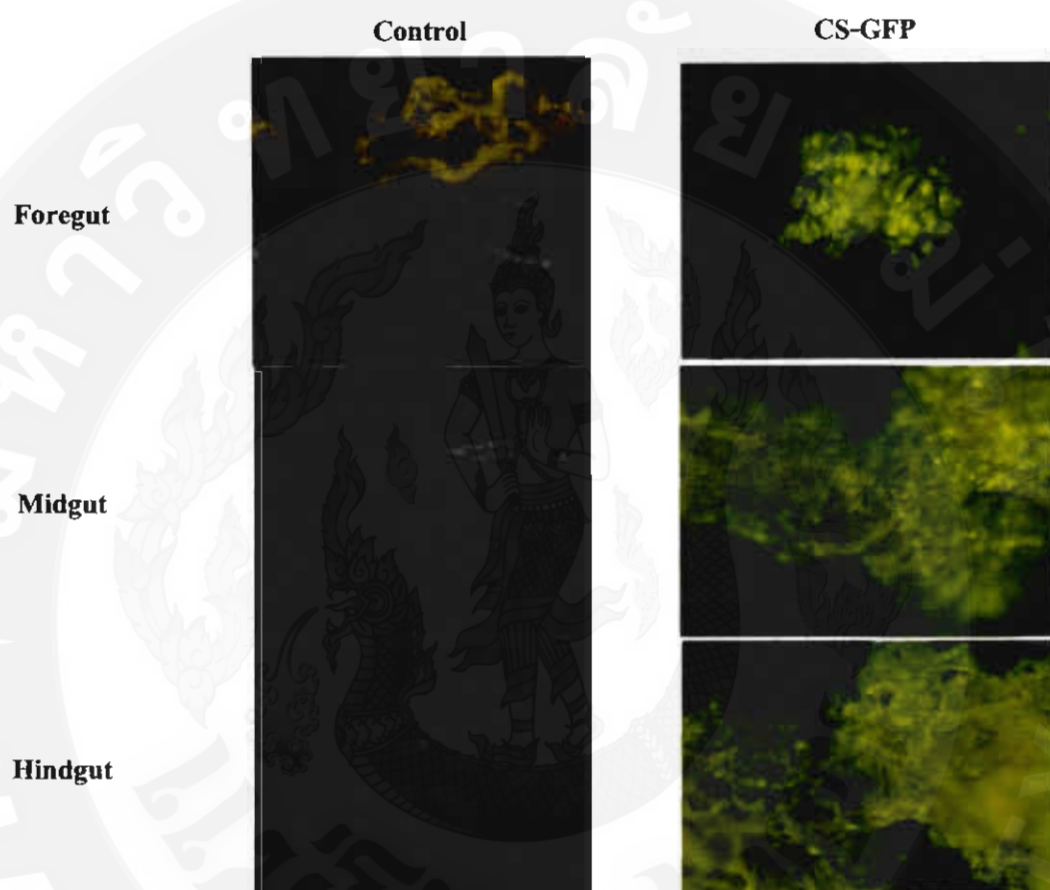
(In vivo releasing efficiency)

3.1 การย่อยอนุภาคนาโนในโคโคซานลำไส้กึ่งก้ามกราม

ให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) โดยใช้กึ่งก้ามกราม ขนาด 150 กรัม เก็บตัวอย่างระบบย่อยอาหาร หลังการให้อาหารที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 15, 30 นาที, 1, 2 ชั่วโมง โดยทำการตัดลำไส้ทั้งหมด แล้วแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ลำไส้ส่วนหน้า (foregut) ลำไส้ส่วนกลาง (midgut) และ ลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) นำลำไส้ที่ผ่านเปิดแล้ว ไปส่องกล้องจุลทรรศน์ผลออเรสเซนซ์ สังเกตดูการเรืองแสงของโปรตีน GFP หากอนุภาคนาโนโคโคซานถูกย่อยและปลดปล่อยโปรตีนได้ จะเห็นการเรืองแสงอย่างชัดเจน พบว่า เห็นการเรืองแสงเริ่มต้นในตัวอย่างลำไส้ส่วนหน้าที่ 15 นาที และมีการกระจายไปยังลำไส้ส่วนกลางและส่วนท้าย เพิ่มขึ้นตามลำดับเวลา แสดงว่า อนุภาคนาโนโคโคซานสามารถถูกย่อยได้ในเวลาอันสั้น ที่เวลา 15 นาที โดยเริ่มต้นที่ลำไส้ส่วนหน้า ดังภาพที่ 25-28

3.2 การย่อยอนุภาคนาโนในโคโคซานลำไส้ปลานิล

ให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) โดยใช้ลูกปลานิล ขนาด 150 กรัม ทำการทดลองเช่นเดียวกับกึ่งก้ามกราม พบว่า อนุภาคนาโนโคโคซานสามารถถูกย่อยได้ ที่เวลา 15 นาที โดยเริ่มต้นที่ลำไส้ส่วนหน้า ดังภาพที่ 29-32 เช่นเดียวกับกึ่งก้ามกราม แต่การเรืองแสงของโปรตีน GFP ในปลานิลไม่ชัดเจนเท่ากับในกึ่งก้ามกราม อาจเนื่องมาจากอาหารปลานิลมีเส้นใยสูง โมเลกุลของโปรตีน GFP เข้าเกาะฝังอยู่ได้ ทำให้บดบังการเรืองแสงได้

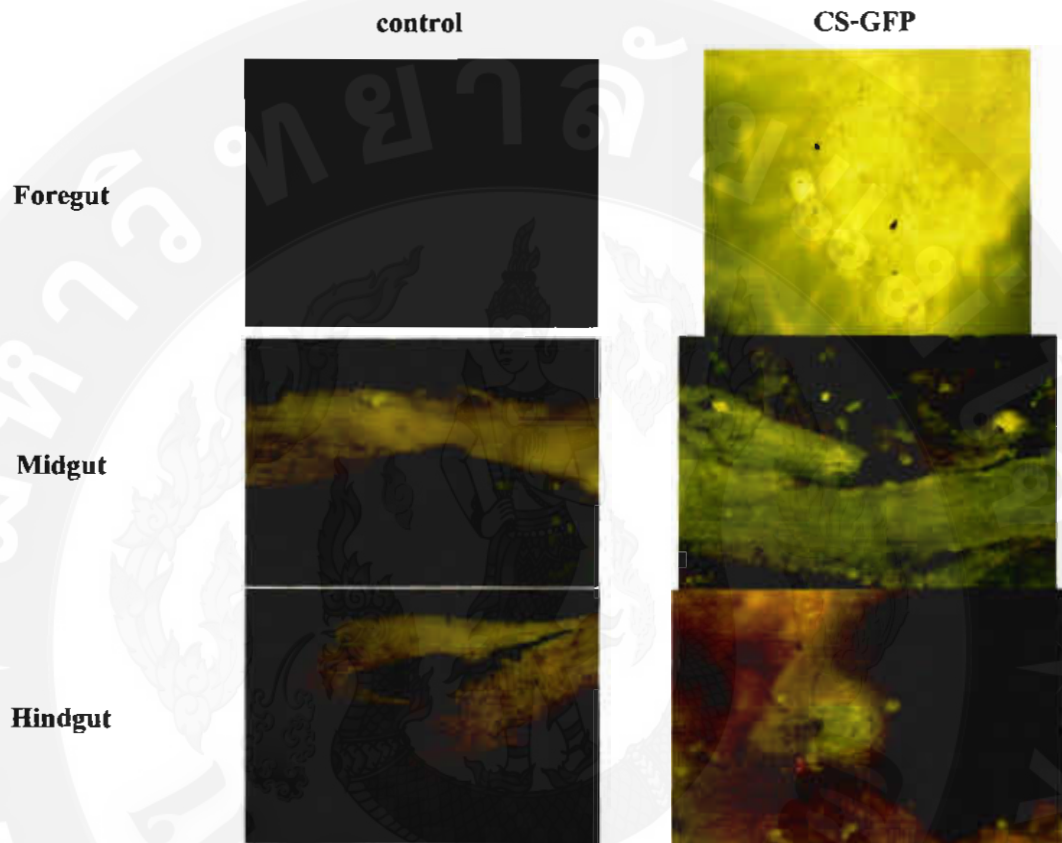


ภาพที่ 25 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งก้ำกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซาน
บรรจุโปรตีน

เรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 15 นาที (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

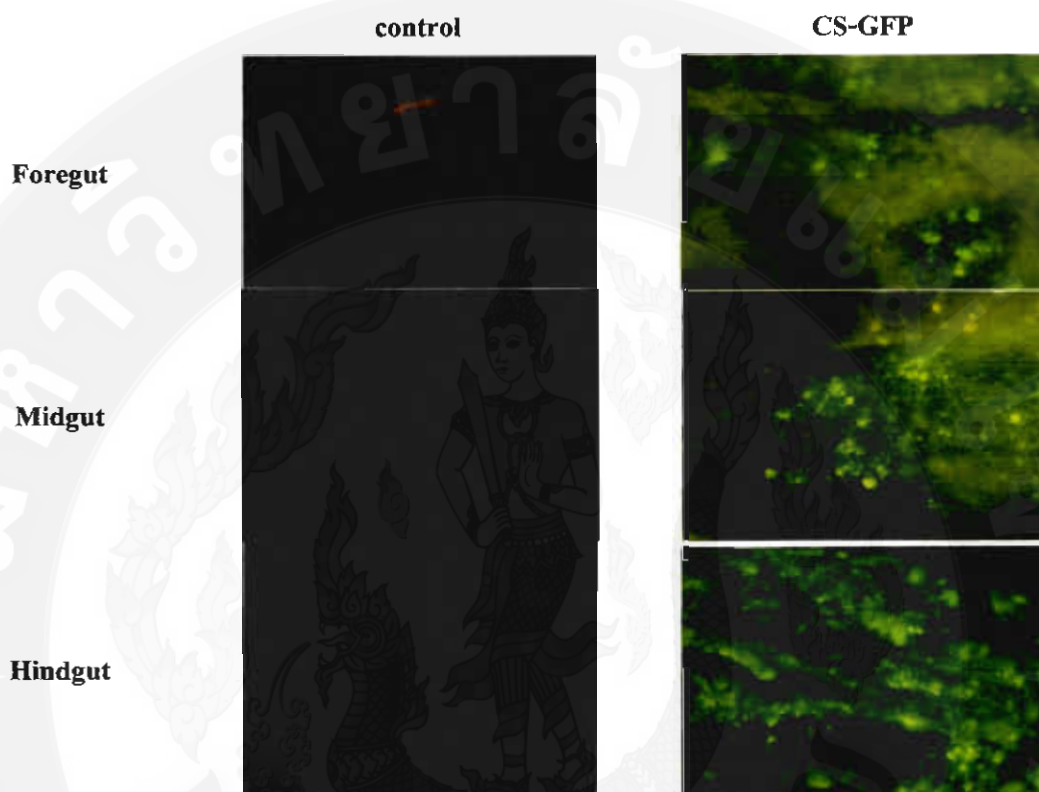


ภาพที่ 26 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งถาวร หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซาน
บรรจุโปรตีน

เรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 30 นาที (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : กึ่งถาวรที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งถาวรที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

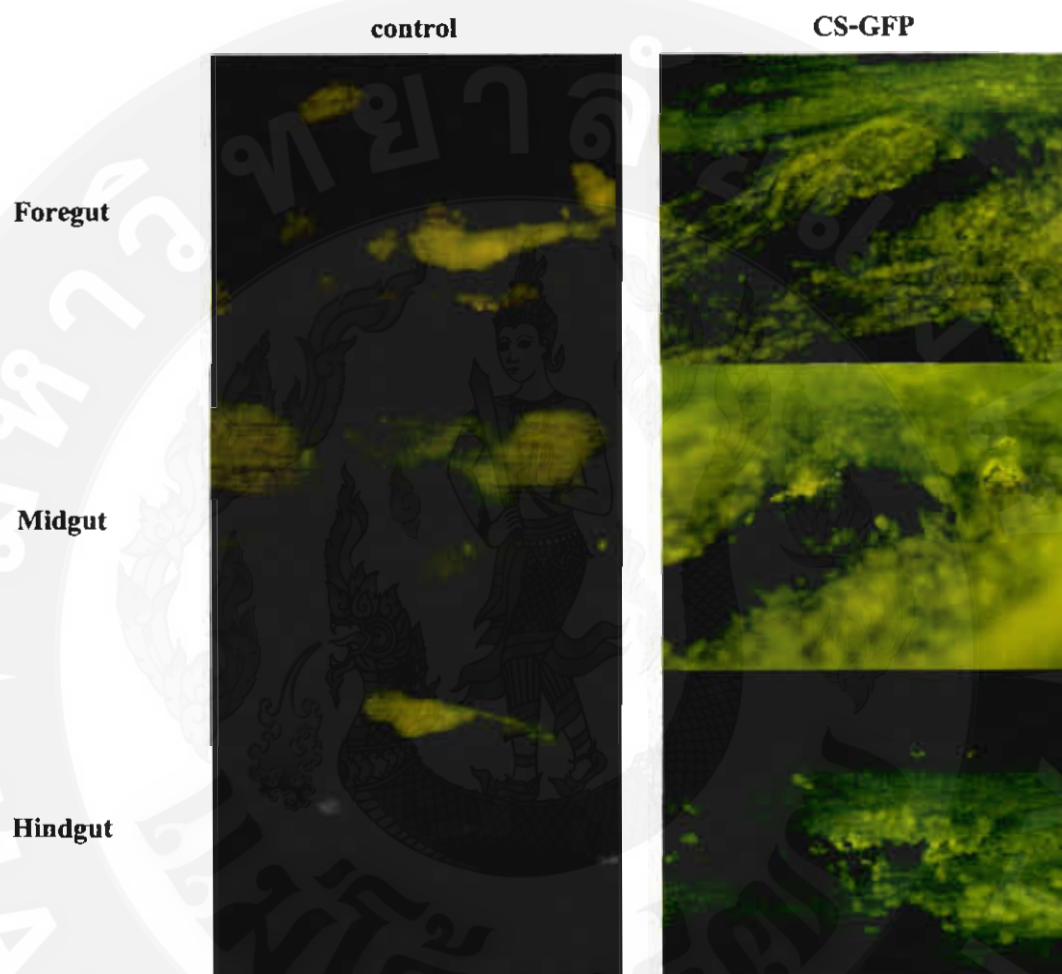


ภาพที่ 27 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งก้ำกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโตซาน
บรรจุโปรตีน

เรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

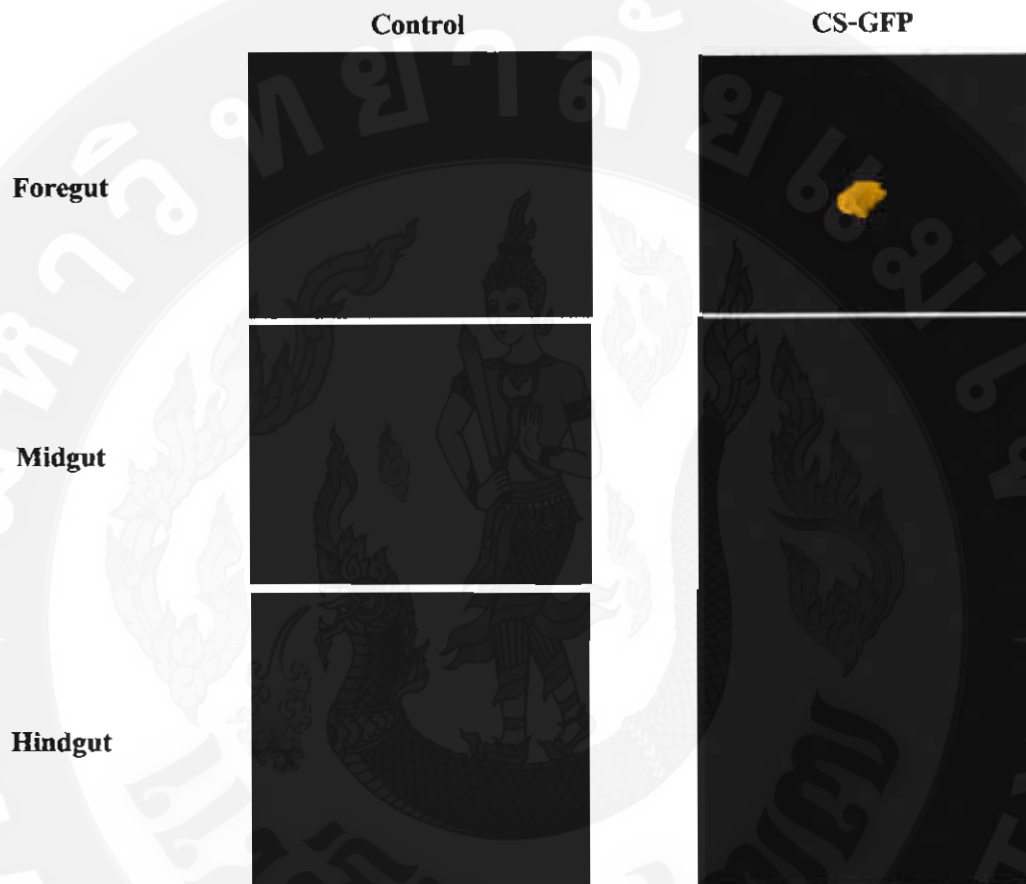


ภาพที่ 28 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ก้นกวม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซาน
บรรจุโปรตีน

เรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : ก้นกวมที่รับประทานอาหารปกติ

CS-GFP : ก้นกวมที่รับประทานอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง



ภาพที่ 29 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ

โปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 15 นาที (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

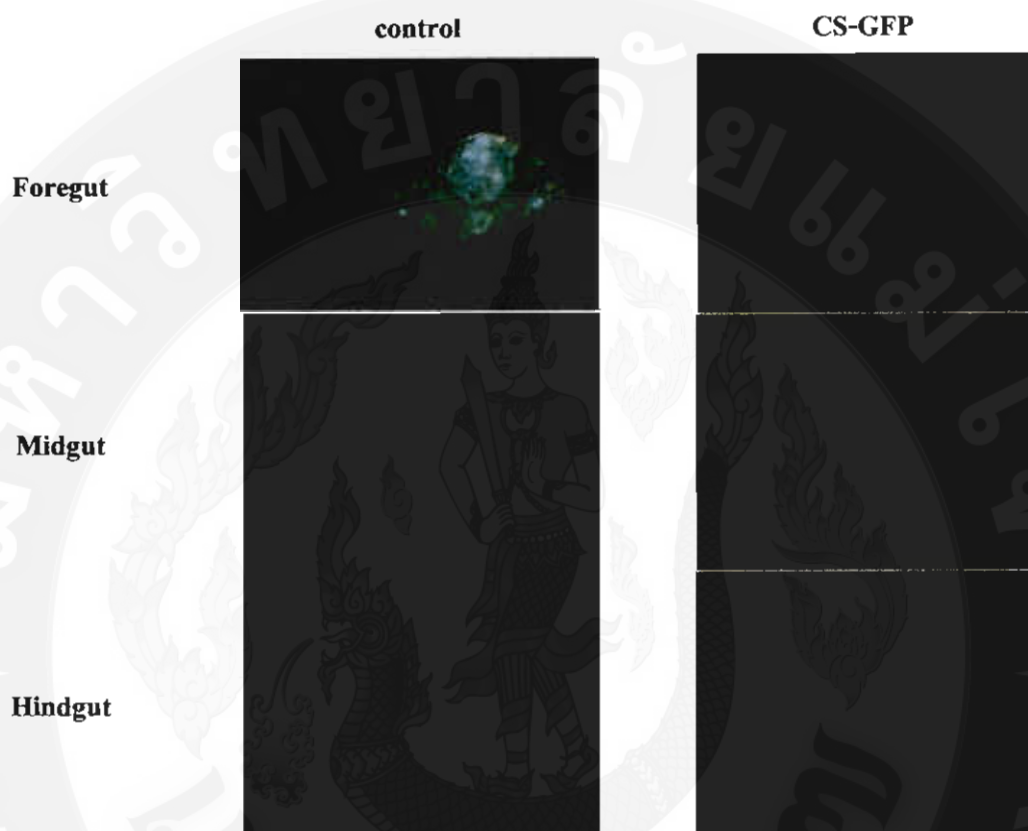


ภาพที่ 30 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ทำให้ปลานิลหลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ

โปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 30 นาที (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP :ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

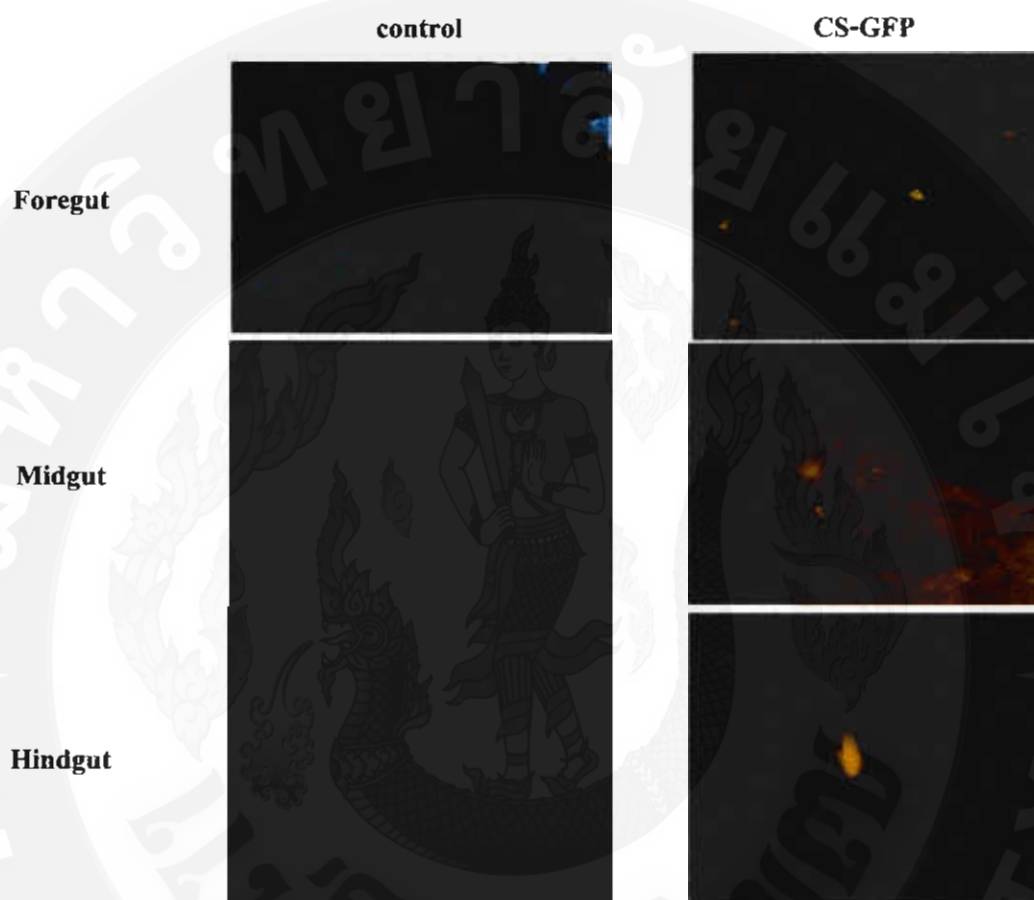


ภาพที่ 31 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ

โปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง



ภาพที่ 32 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ

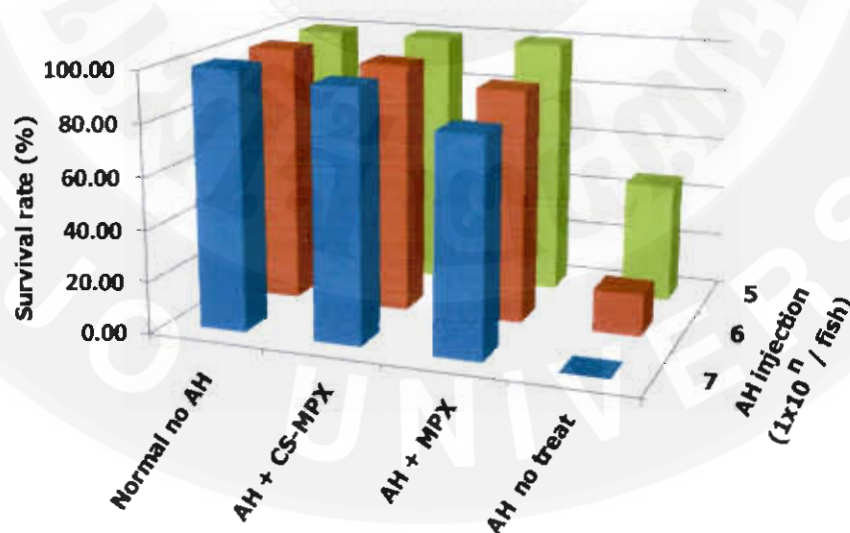
โปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

4. ประสิทธิภาพการนำส่งสารชีวภาพของอนุภาคนาโนไคโตซาน

ได้ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonashydrophila* ที่ปริมาณต่างๆ ให้ปลานิล ขนาด 150 กรัม และทดสอบการรักษาโดยให้อาหารผสมสารสกัดใบหูกวาง 0.1 % ในรูปสารสกัดธรรมชาติและสารสกัดบรรจุในอนุภาคนาโนไคโตซาน โดยเปรียบเทียบกับปลานิลปกติและปลานิลที่ได้รับเชื้อแต่ไม่มีการให้สารสกัดใบหูกวาง ในการรักษา สังเกตอาการและนับจำนวนปลาที่รอดตาย เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อในปริมาณสูง (1×10^7 cfu/ตัว) และไม่ได้รักษา ปลาตายทั้งหมดภายในเวลา 3 วัน ส่วนปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อในปริมาณกลาง (1×10^6 cfu/ตัว) และต่ำ ใน (1×10^5 cfu/ตัว) ปลาทยอยตายตลอด 7 วัน ส่วนปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ และรักษาด้วยสารสกัดใบหูกวาง มีอัตราการรอดตายมากกว่า 80% แต่สังเกตได้อย่างชัดเจนว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดใบหูกวาง บรรจุในอนุภาคนาโนไคโตซานมีอัตราการรอดมากกว่า 95% ในปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณสูงและกลาง และมีอัตรารอด 100% ในปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณต่ำ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนไคโตซานช่วยในการนำส่งสารสกัดสมุนไพร ให้เข้าสู่ร่างกายของปลานิลได้ดี



ภาพที่ 33 ประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Aeromonas Hydrophila* ในปลานิล

สรุปผลการวิจัย

1. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน

การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานโดยใช้ TPP เป็น crosslinker วิธีที่เหมาะสม คือ วิธีไอโอโนโทรพิกเจเลชันซึ่งเป็นวิธีที่ให้โครงสร้างของอนุภาคนาโนเป็นทรงกลม มีขบวนการง่าย ไม่สลับซับซ้อน ไม่ต้องใช้สารกำจัดน้ำมัน และไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนซึ่งจะต้องให้ปลาและกุ้งกินต่อไป

ดังนั้นในการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานของงานวิจัยนี้ จะใช้ไคโตซาน 81.45 %DD ที่ขนาด 140kDa ที่การกวน 900 -1,300 rpm จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานขนาดเล็กที่สุด ระหว่าง 262.4–304.9 nm และสามารถสรุปคุณสมบัติของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าที่ได้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนไคโตซาน

%DD	MW (Da)	% CS	SEM size	TEM size (nm)	nanosizer (nm)
77.09	1,519,039	0.2	150-300 um	-	443.00
		0.5	5-300 um	-	549.90
81.45	139,265	0.2	150-250 nm	-	183.50
		0.5	-	10-200	262.16
82.95	385,269	0.2	-	-	254.33
		0.5	-	50-300	303.86
87.31	252,995	0.2	5-20 um	-	242.70
		0.5	100-1,000 nm	20-500	517.83
91.62	375,134	0.2	0.1-20 um	100	211.33
		0.5	0.1-20 um	-	299.93

2. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-สารชีวภาพ

ในการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารชีวภาพ โดยใช้ไคโตซาน 81.45 %DD 140 k สำหรับอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดใบหูกวาง (CS – MPX) ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 % (w/v) ได้ประสิทธิภาพการบรรจุ เท่ากับ 70.53, 71.42, 72.47, 76.81 และ 68.41 % ตามลำดับ สรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้น 1.5 % ได้ประสิทธิภาพการบรรจุสูงสุด

3. การปลดปล่อยสารชีวภาพจากอนุภาคนาโนไคโตซาน

ประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารชีวภาพในหลอดทดลอง ที่สภาวะ pH = 7.0 ที่ความเข้มข้น 1.5 % (w/v) สารชีวภาพเริ่มถูกปลดปล่อยตั้งแต่วันที่ 1 ชั่วโมง โดยปลดปล่อยได้สูงสุด 75.03 %

ส่วนประสิทธิภาพการปลดปล่อยในลำไส้สัตว์น้ำ พบว่า ในกุ้งก้ามกรามและปลานิล อนุภาคนาโนไคโตซานสามารถถูกย่อยได้ที่ลำไส้ส่วนต้น ที่เวลา 15 นาทีหลังกินอาหาร โดยที่เวลา 2 ชั่วโมง หลังกินอาหาร สารชีวภาพจะกระจายไปทั่วลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลางและส่วนปลาย

4. การนำส่งสารชีวภาพของอนุภาคนาโนไคโตซาน

อนุภาคนาโนไคโตซานสามารถช่วยให้การนำสารชีวภาพเข้าสู่ร่างกายของปลานิลได้ดี โดยช่วยให้ปลานิลติดเชื้อ *Aeromonashydrophila* และได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดใบหูกวาง มีอัตราการรอดสูงกว่า ปลานิลติดเชื้อและได้รับอาหารผสมสารสกัดใบหูกวาง

บรรณานุกรม

- กฤษฎา อาโป. 2550. การเตรียมอนุภาคโคโคซานห่อหุ้มวิตามินซี เพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมคอสเมติกส์. โครงการจัดตั้งภาควิชาเทคโนโลยีทางกระบวนการเคมีและฟิสิกส์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิราพร โรจน์ทินกร, ศรีกาญจนา คล้ายเรือง และ จงกล พรหมยะ. 2552. สมุนไพรไทยทดแทนยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2547-2549.
- ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์. ม.ป.ป. การพัฒนาเชื้อพลาสมาไมเคิลฟิลลิปส์ปาร์มที่แสดงโปรตีนเรืองแสงสีเขียว เพื่อเป็นโมเดลในการตรวจกรองสารด้านมาลาเรีย. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ.
- ฉัฐพร อนุมานศิริกุล. ม.ป.ป. อนุภาคนาโนที่ทำจากโคโคซานสำหรับการกักเก็บสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอาง. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฉิรพิทย์ สุปงกช. 2550. การศึกษาระบบนำส่งยีน โยโคโคซานนาโนพาร์ติเคิล. ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นลินา ประไพรักษ์สิทธิ์ และ พรรัมภา งามศิริ. 2550. การเตรียมและศึกษาการปลดปล่อยแบบควบคุมของยาอะม็อกซิซิลลินจากบีคแอลจินเนด – โคโคซาน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 (2550). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ปาริชาติ พุ่มขจร. ม.ป.ป. วิธีการติดตาม *Lactobacillus plantarum*. N014 โดยอาศัยยีน GFP. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2543. ประโยชน์ที่ได้รับจากการใช้โคโคซานในการเลี้ยงสุกร. เอกสารประกอบการประชุม สัมมนาพร้อมนิทรรศการ เรื่อง เกษตรยุคใหม่กับโคโคซาน ภาค 2 จัดโดย ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ร่วมกับ ชมรมโคโคซาน วันที่ 9-10 พฤศจิกายน 2543 อาคาร 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, นิรันดร์สัพพวิญญู และสุวลี จันทรกระจ่าง. 2543. การใช้โคโคซานในเป็ดเนื้อ. เอกสารประกอบ การประชุมสัมมนาพร้อมนิทรรศการ เรื่อง เกษตรยุคใหม่กับโคโคซาน-โคโคซาน ภาค 2 จัดโดย ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุ แห่งชาติ ร่วมกับ ชมรมโคโคซาน วันที่ 9-10 พฤศจิกายน 2543 อาคาร 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสรยุทธ ชิริณิตยาธาร. ม.ป.ป. เอกสารประกอบวิชาการเรื่องไคติน-ไคโดซาน. อควาควิ กรุ๊ปจำกัด, กรุงเทพฯ.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสุวลี จันทร์กระจ่าง. 2543. การใช้ไคโดซานในไก่เนื้อ. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาพร้อมนิทรรศการ เรื่อง เกษตรยุคใหม่กับไคติน-ไคโดซาน ภาค 2 จัดโดย ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ ร่วมกับ ชมรมไคติน-ไคโดซาน วันที่ 9-10 พฤศจิกายน 2543 อาคาร 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- พรรณทิพย์ ห่อศรีสัมพันธ์. 2548. เครื่องวิเคราะห์สารด้วยอินฟราเรด. LAB TODAY 4.น. 33-38.
- พิศิษฐ์ สิงห์ใจ. ม.ป.ป. การวัดขนาดอนุภาคระดับนาโนโดยใช้เครื่อง DLS และ Zeta Potential Sizer. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 148-153.
- ภาวดี เมฆะคานนท์, อศิรา เฟื่องฟู และ ก้องเกียรติ คงสุวรรณ. 2543. ไคติน ไคโดซาน. กรุงเทพฯ: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 10 หน้า.
- มงคล สุขวัฒนาสินธิ์. 2544. การหาระดับอะซิติลเลชันของไคโดซาน. น.7. ใน คู่มือปฏิบัติการประชุมเชิงปฏิบัติการ ไคตินและไคโดซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิควิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์. 886 น.
- เขาวภา ไหวพริบ. 2534. การผลิตไคตินและไคโดซานจากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-71.
- รังรอง ชกसान. ม.ป.ป. การปรับโครงสร้างของไคโดซานเพื่อให้ได้นาโนสเฟียร์. โครงการจัดตั้งภาควิชาเทคโนโลยีทางกระบวนการเคมีและฟิสิกส์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เรียวสุเกะ ซาซาวา, เกซุเกะ วาดานามะ, และลิล่า เรืองแป้น. ม.ป.ป. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายทอดขึ้นในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานประจำปี 2548 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จันทบุรี.
- ลิล่า เรืองแป้น. 2542. ไคโดซาน, สัตว์น้ำ. 12(142), 65-68.

- วิภาวี ไชว่วน. 2544. การหามวลโมเลกุลของโคโคซานด้วยวิธี Intrinsic Viscosity. น.17-21. ใน คู่มือปฏิบัติการประชุมเชิงปฏิบัติการ โคโคตินและโคโคซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิลาวัณย์ ทองคง. ม.ป.ป. การเตรียมอนุภาคโคโคซานขนาดซับไมครอนโดยใช้เทคนิคอัลตราโซนิค อะตอมไมเซชัน. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาวิตรี ศิลาเกษ และ กิจการ สุขมาตย์. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและการใช้วัคซีนในกุ้งกุลาดำ : II. การผลิตวัคซีนจาก *Vibrio harveyi* และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 663-676 (2543)
- สุพรรณา ปานทุม และ สินีนาฏ ศิริ. ม.ป.ป. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนเข้าเอ็มบริโอ ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) โดยวิธีอิเล็กโตรพอเรชัน. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุวบุญ จิราฉายชัย, รังรอง ยกส้าน และโกสม สมักรินทร์. 2544. สมบัติทางเคมีและกายภาพของโคโคตินโคโคซาน. น.12, 17, 32. ใน เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการโคโคตินและโคโคซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- หนึ่ง เดียอำรุง. ม.ป.ป. การใช้ gus ยีนเพื่อศึกษาพฤติกรรมของไรโซเบียมในระบบนิเวศ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร.
- อดิพล พัฒิยะ. ม.ป.ป. การแสดงออกของยีนโปรตีนเรืองแสงสีเขียวใน *Bacillus* spp. สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อานุภาพ ทองธรรมชาติ และ สมนึก จารุติลกกุล. 2548. การศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนจากโคโคซานอนุภาคนาโน. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Ajun, W., Yan, S., Li, G., and Huili, L. 2008. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study. Carbohydrate polymers.
- Amidi M., Romeijn S.G., Verhoef J.C., Junginger H.E., Bungener L., Huckriede A., Crommelin D.J.A. and Jiskoot W. N-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. Vaccine 25(1) : 144-153 (2007).

- Benjakul, S. and Wisitwuttikul, P. 1994. *Asean Food Journal*. 9: 136.
- Borges O., Cordeiro-da-Silva A., Romeijn S.G., Amidi M., de Sousa A., Borchard G. and Junginger H.E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release* 114(3) : 348-358 (2006).
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., and Alonso, M. J. 1997. Novel hydrophilic chitosanpolyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Pol Sci*. 63(1):125-132.
- Chandy, T., and Sharma, C.P. 1992. Chitosan Beads and Granules for Oral Sustained Delivery of Nifedipine: in vitro Studies. *Biomaterials*. 13(13): 949-952.
- Chang, K.L.B. Tsai, G. Lee, J. and Fu, W.R. 1997. Heterogeneous N-Deacetylation of Chitin in Alkaline Solution. *Carbohydrate Research*. 303: 327-332.
- Chen, R. H. and Tsaih.M.L. 1998. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23: 135-141.
- Chen F., Wang Z C. and Lin C J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. *Materials Letters*, Volume 57, Issue 4, December, Pages 858-861 (2002).
- Chinadit, U., Wanichpongpan, P., Ng., C.H., Stevens, W.F. and Chandkrachang, S. 1998. Chemical deacetylation of shrimp chitin in different conditions. *Advance in Chitin Science*. 3: 165-168.
- Domard, A. and Chaussard, G. 2002. New approach in the study of the production of chitosan from squid pens: kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Advances in Chitin Science*. 5: 1-5. ISBN: 974-229-412-7.
- Dunn, Q., Li, E.T., Grandmaison, E.W. and Goosen, M.F.A. 1997. Applications and properties of chitosan. *Applications of chitin and chitosan*, Pennsylvania: Technomic Publishing, p.12.
- Felse, P.A. and Panda, T. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*. 20: 505-512.
- Frank, A. 1997. *Infrared Spectroscopy. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 543 p.

- Gagné, N. and Simpson, B. K. 1993. Use of proteolytic enzymes to facilitate the recovery of chitin from shrimp wastes. *Food Biotechnol.* 7: 253-263.
- Hirano, S. 1996. Chitin Biotechnology Application. *Biotechnology Annual Review.* 2: 749-753.
- Johnson .andPeniston. 1982. Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan-A Review. Department of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyungsan, South Korea. 27 – 52.
- Kumar S.R., Ahamed V.P.I., Sarathi M., Basha A.N. and Hameed S. Immunological response of *Penaeusmonodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish &Shellfish Immunology* 24 : 467-478 (2008).
- Kittikaiwan P., Powthongsook S., Pavasant P. and Shotipruk A. Encapsulation of *Haematococcuspluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement.*Carbohydrate Polymers* (2007).
- Kong M., Chen X.G., Xing K. and Park H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144 : 51–63 (2010).
- Lei CX., Hu SQ., Shen GL. and Yu RQ. Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide. *Talanta* 59(5) : 981-988 (2003).
- Lertsutthiwong, P., Ng, C.H., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F. 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals.* 12 (1): 11-18.
- Lertsutthiwong, P., Chandkrachang, S., Nazhad, M.M., and Stevens, W.F. 2002. Chitosan as a dry strength agent for paper. *Appita Journal.* 55(3): 208-212.
- Li, C.F. and Wu, J.C. 1998. Chitosan benefits cultivation of vegetables. *Advances in Chitin Science.* 3: 448-452.
- Li, F., Liu, W.G. and Yao, K.D. 2002. Preparation of oxidized glucose-crosslinked N-alkylated chitosan membrane and in vitro studies of pH-sensitive drug delivery. *Biomaterials.* 23: 343-347.

- Li, Q. Dunn, E. T. Grandmaison, E.W and Goosen, 1992. Applications and Properties of Chitosan. *Bioactive and Compatible Polymers*. 7: 370-397.
- Li, Z., Liu, X.F., Zhuang, X.P., Guan, Y.L. and Yao, K.D. 2002. Manufacture and properties of chitosan/N,O-carboxymethylated chitosan/viscose rayon antibacterial fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 84(11): 2049-2059.
- Lim, L-Y., Khor.E and Ling C-E. 1999. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*.. 48: 111-116.
- Lim, S. and Hudson, S.M. 2002. A novel chitosan derivatives as a textile finish. *Advances in Chitin Science*. 6: 241-242. ISBN: 82-471-5901-5.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N. J. Farr, A.L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265.
- Merck Index. 1996. Edited by Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., Kinneary, J.F. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
- Mi, F-L.; Sungb, H-W.; Shyuc, S-S.; Sua, C-C and Peng, C-K. 2003. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*. 44; 6521-6530.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin. Oxford: Pergamon Press.
- Myint, K.T., Ng, C.H., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F. 2002. Optimal demineralization of crab shell waste for chitin production. *Advances in Chitin Science*. 5: 15-18. ISBN: 974-229-412-7.
- Nie H. and Wang CH. Fabrication and characterization of PLGA/HAP composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *Journal of Controlled Release* 120 : 111-121 (2007).
- Ning J-F, Zhu W, Xu J-P, Zheng C-Y, Meng X-L. Oral delivery of DNA vaccine encoding VP28 against white spot syndrome virus in crayfish by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* 27

Nanosizer.[Online].Available

<http://www.uv.es/icmuv/Fotos%20equipos/NanoZ%20+%20titrador.jpg> (16 August 2011).

Nan, X., Feng, T., Shengjun, L., Hong, L., Changjun L., Jian, Y. and Chunnian, He. (2009).

Chitosan polyelectrolyte nanoparticles as protein delivery systems. The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering.p1-5.

Csaba, N., Koping-Hoggard, M.and Alonso, M. J. (2009). Ionicallycrosslinked

chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery.

International Journal of Pharmaceutics

No, H.K. and Meyers, S.P. 1997. Preparation of chitin and chitosan. Chitin Handbook.p. 475-489.

ISBN 88-86889-01-1.

No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H. and Meyers, S.P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and

chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology. 74(1-2): 65-72.

Perkin Elmer Life and Analytical Sciences. 2009. FTIR spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). Perkinelmer precisely.1-5 p.

Rajesh Kumar, S., Paramesaran, V. 2007. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery

of DNA vaccine in Asian sea bass(Latescalcarifer) to protect from Vibrio(Listonellaanguillarum).Fish&Shellfish Immunology. 25,47-56.

Rao, M.S., Munoz, J. and Stevens, W.F. 2000. Critical factors in chitin production by fermentation

of shrimp biowaste. ApplMicrobiolBiotechnol. 54: 808-813.

Roberts, G.A.F. 1997. Chitosan production routes and their role in determining the structure and

properties of the product. Proceedings of 7th International Conference on Chitin Chitosan. Lyon, France. p. 22-31.

Roberts, G.A.F. and Wood, F.A. 2001. A study of the influence of structure on the effectiveness of

chitosan as an antifelting treatment for wool. Journal of Biotechnology. 89: 297-304.

Scanning Electron Microscope.[Online].Available

http://www.tech.eng.tohoku.ac.jp/sosiki/goudou/index_SEM-EDX2.e.html (16 August 2011).

Scanning Electron Microscope.[Online]. Available

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schema_MEB_\(en\).svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Schema_MEB_(en).svg) (16 August 2011).

Shigemasa, Y. Morimoto, M. Saimoto, H. and Minami, S. 1998. Application of chitin and chitosan for biomaterials. Proceeding of the Third Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium. 8-10 September 1998. Keelung Taiwan.pp.47-54.

Siri-Upatham, C. 2002. Radiation degradation of chitosan and its application for young orchid plant growth promotion, *Advances in Chitin Science*. 5: 475-478. ISBN: 974-229-412-7.

Skoog, D.A. and J.J. Leary. 2007. Principles of Instrumental Analysis. 169-173 p.

Stevens, W.F. 2002. Production and storage of high quality chitosan from shrimp, crab and fungus. *Advances in Chitin Science*. 5: 6-11. ISBN: 974-229-412-7.

Transmission Electron Microscope.[Online].Available

<http://www.tech.eng.tohoku.ac.jp/sosiki/goudou/jpg/TEM.jpg> (16 August 2011).

Transmission Electron Microscope.[Online]. Available

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Scheme_TEM_en.svg (20 August 2011).

Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C. and Pan, C.L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science* 68(1): 170-177.

U.S. Department of Commerce, Fisheries of the United States, 1995, July 1996.

WANG, C., FU, X. and YANG, L. (2007). Water-soluble chitosan nanoparticles as a novel carrier system for protein delivery. *Chinese Science Bulletin* 52; 883-889.

Wanichpongpan, P., Tanapongsathorn, N. and Chandkrachang, S. 2002. Application of chitosan as bioflocculation in shrimp pond. *Advances in Chitin Science* 5: 527-531. ISBN: 974-229-412-7.

Win, N. N. 1996. Removal of Heavy Metals Using Chitosan. Master of Environmental Thesis.Environmental Science and Technology.Asian Institute of Technology. Thailand. Bangkok. 68 p.

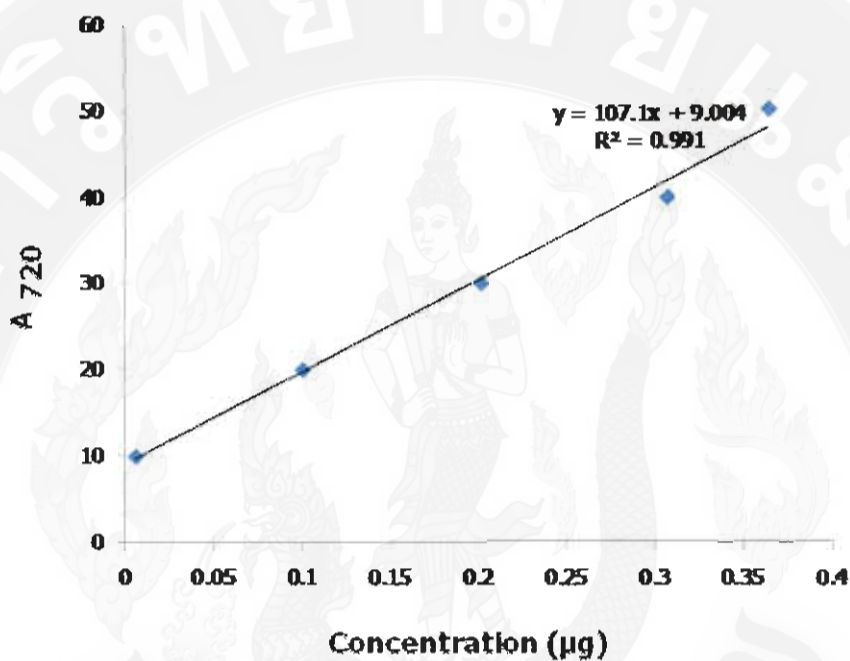
Win, N. N., Pengju, G. and Stevens, W.F. 2000. Deacetylation of chitin by fungal enzymes. *Advance in Chitin Science*. 4: 55-62. ISBN: 3-9806494-5-8.

- Win, N.N. and Stevens. W.F. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 57: 334-341.
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J. and Arpo, K. 2010. Encapsulation of ascorbylpalmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76; 292-297.
- Yongmei, X. and Yumin D. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 250: 215-226.



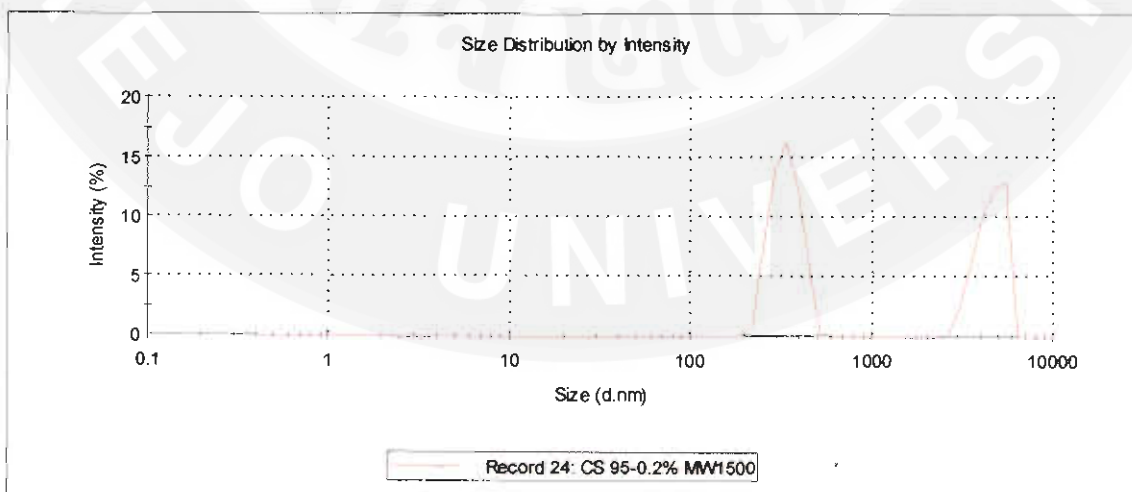
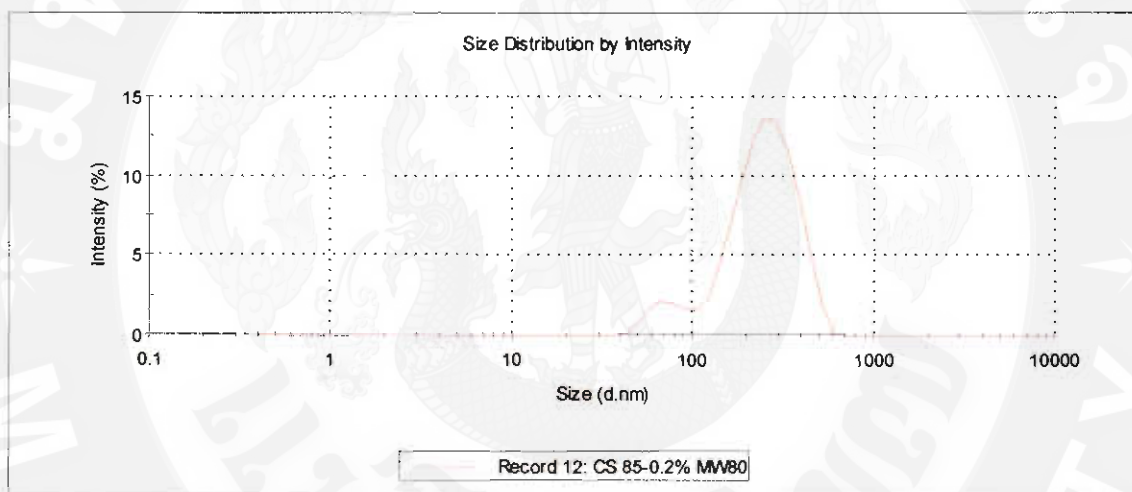
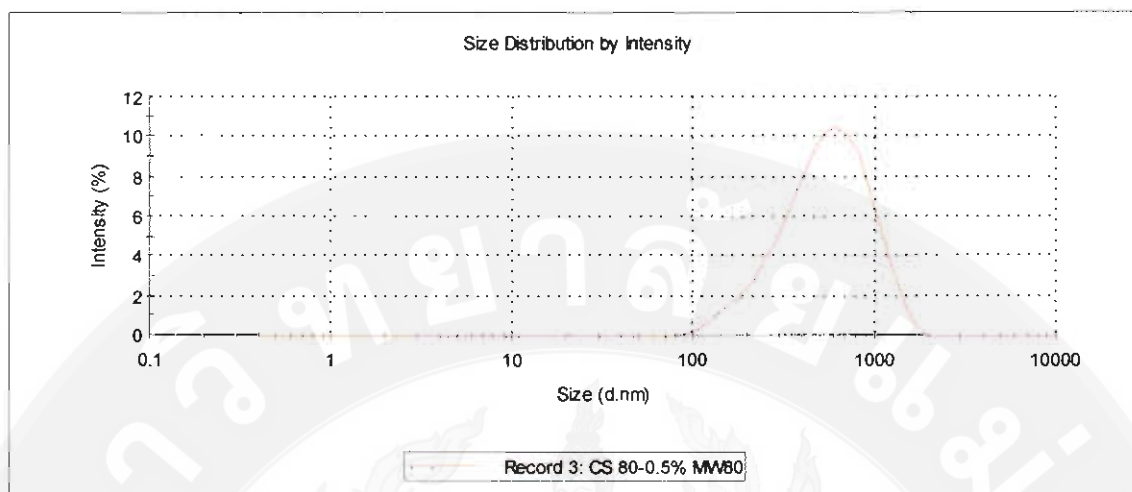
ภาคผนวก

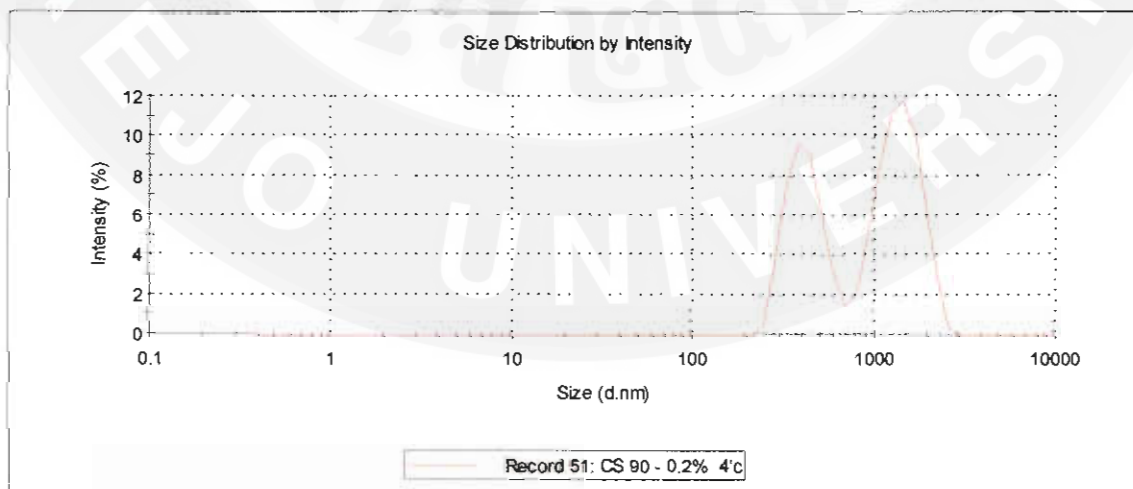
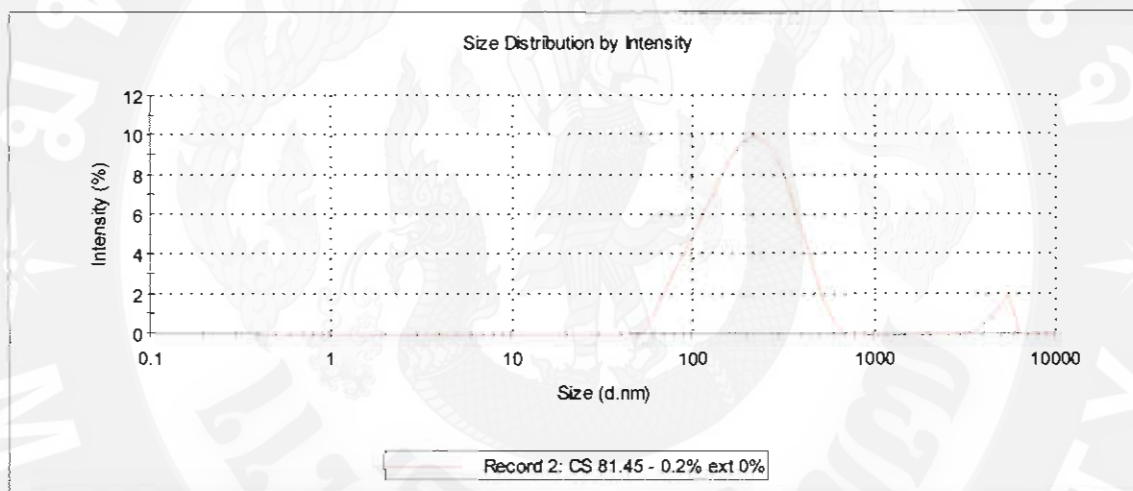
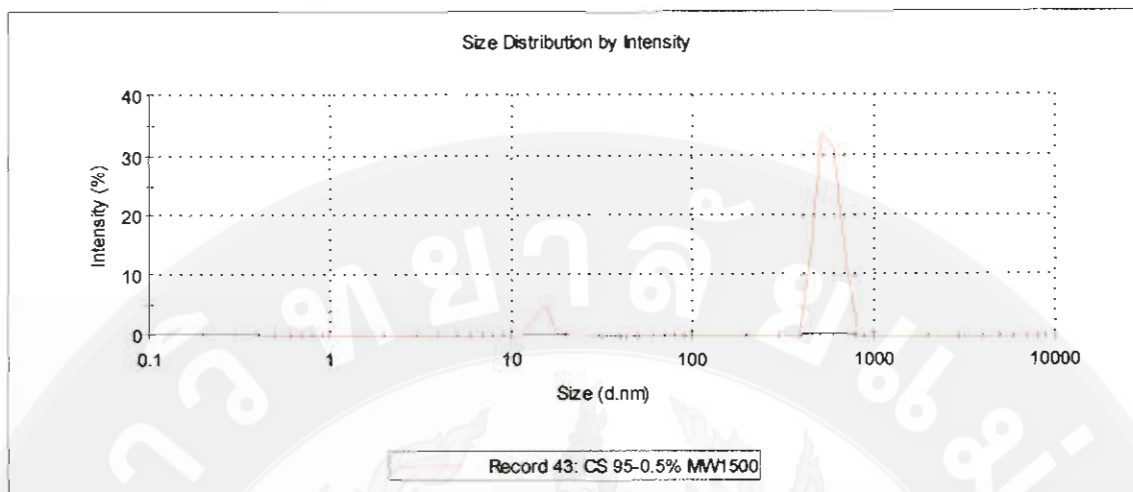
กราฟมาตรฐานแทนนิน

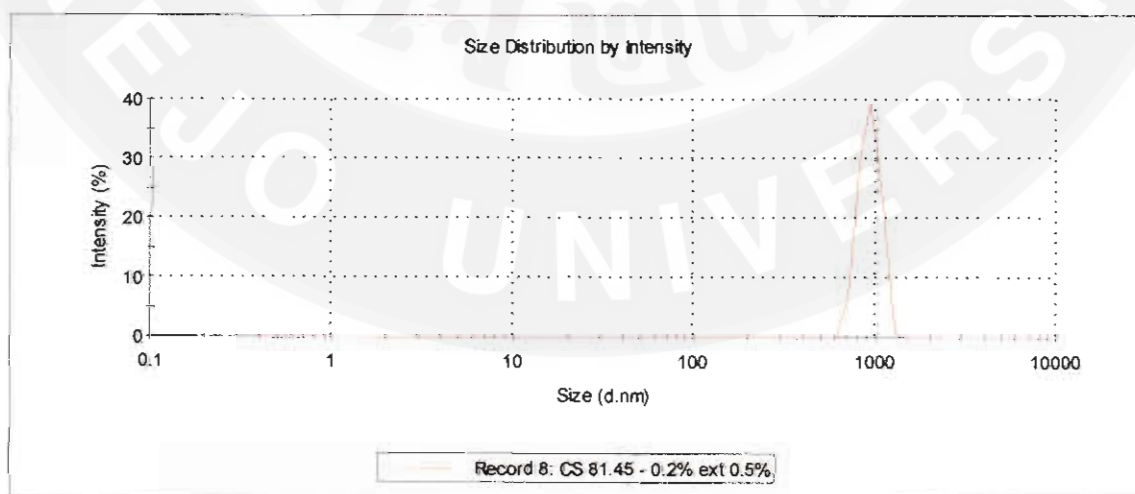
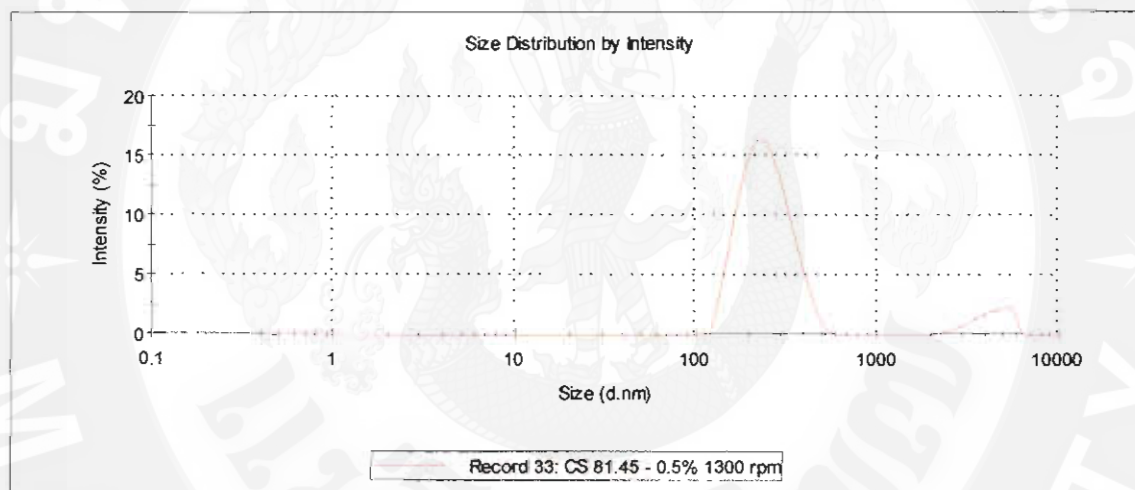
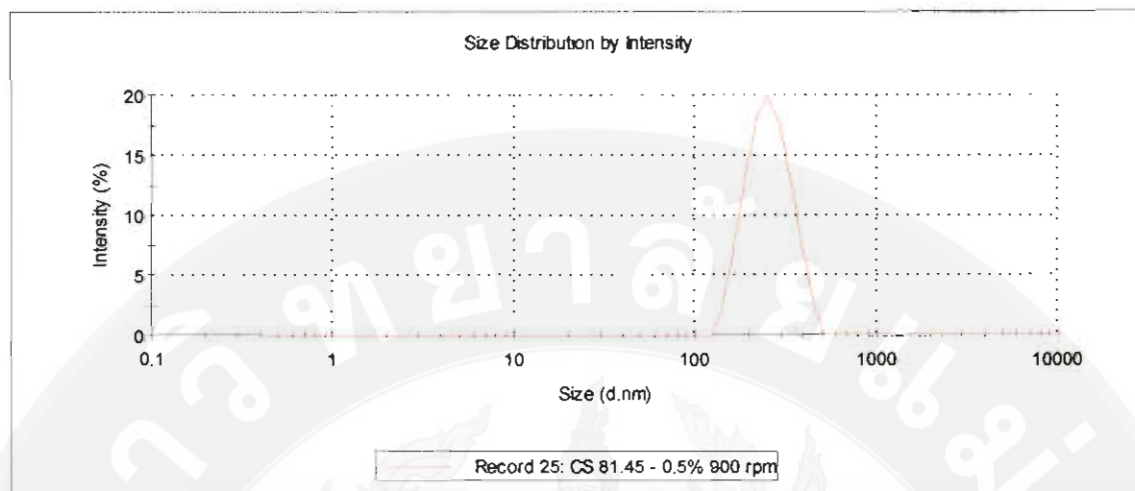


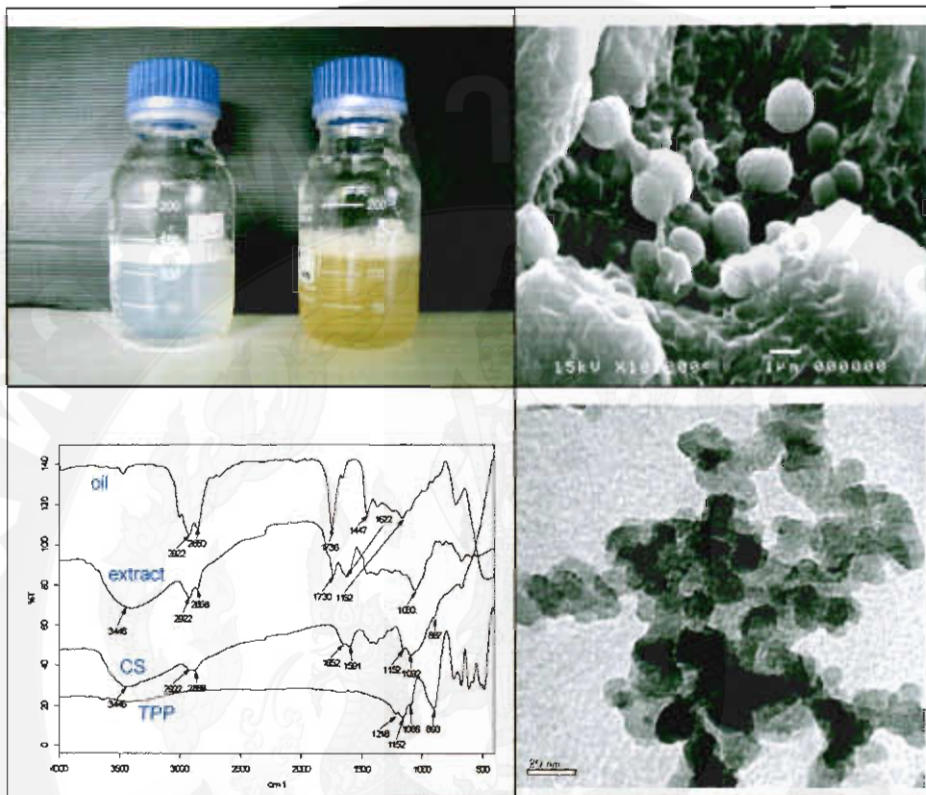
A ₇₂₀	Concentration (µg)
0.006	10
0.1	20
0.201	30
0.308	40
0.365	50

ตัวอย่าง ความแปรผันของขนาดอนุภาคนาโนไคโตซานที่ตรวจสอบด้วย nanosizer









คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ