

## 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 จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมากมายหลากหลายวัตถุประสงค์ ทั้งในทางการแพทย์ 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](http://www.sciencedirect.com) ณ วันที่ 13 สิงหาคม 2550 พบเพียง 5 รายงานเท่านั้น 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 pluvaelis* เคลือบโคโคซาน เพื่อรักษารังควัตถุแดง astaxanthin ได้นานถึง 24 สัปดาห์ (Kittikaiwan et al., 2007)

จะเห็นได้ว่า ถึงแม้เทคโนโลยีอนุภาคนาโนโคโคซานกำลังถูกพัฒนาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่การศึกษาวิจัยด้านการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อยมาก และยังไม่มีการศึกษาวิจัยในระดับอนุภาคนาโนชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ เป็นแหล่งผลิตโปรตีนคุณภาพสูงที่มีราคาไม่แพง เช่น ปลา น้ำจืดชนิดต่างๆ และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้เข้าประเทศสูง โดยเฉพาะการส่งออกกุ้งทะเลที่มีมูลค่าปีละไม่น้อยกว่า 2000 ล้านบาท

การใช้สารสกัดสมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะเป็นแนวทางหนึ่งในการลดยาปฏิชีวนะในสัตว์น้ำ ผู้วิจัย จิราพรและคณะ (2549) รายงานว่ามีสารสกัดสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันและรักษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสำคัญในสัตว์น้ำ เช่น กระเทียม ขะพลูด หูกวาง เปลือกมังคุด เปลือกทับทิม ชาเขียว รวงจืด เป็นต้น แต่เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติทำให้เกิดการสลายตัวและเน่าเสียได้ง่ายทั้งในรูปผงแห้งและของเหลว ดังนั้นอุปสรรคในการผลิตสารสกัดสมุนไพรเพื่อใช้การเพาะเลี้ยง คือ วิธีการเก็บรักษา และอายุการเก็บ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจในการพัฒนาวิธีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีนาโนชีวภาพ

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

## การตรวจเอกซเรย์

### 1. ไคตินและไคโตซาน

ไคติน ( $\beta$ -(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)

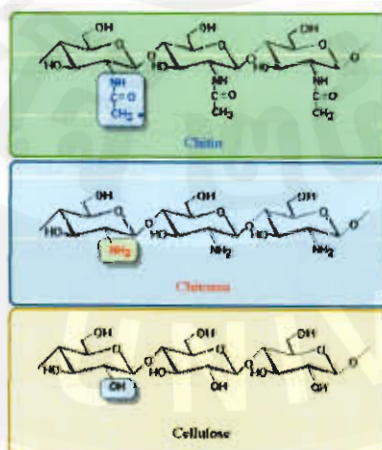
ไคตินไม่สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วและไม่มีขั้ว โดยทั่วไปมักพบไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา รวมทั้งเปลือกของแมลงและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีข้อและปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนหมึก (Merk, 1996) จากการศึกษาของ Muzzarelli (1977) ได้ทำการเสนอรูปแบบของผลึกไคตินในธรรมชาติซึ่งมีโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรงอยู่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

ไคโตซาน ( $\beta$ -1,4-D-glucosamine) หรือ D-glucosamine(2-amino-2-deoxy-D-glucose) หรือ Poly- $\beta$ (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose มีสูตรทั่วไปเป็น (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>) (ลิลา, 2542; ภาวดี และคณะ, 2543) ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 44.7 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.8 และไนโตรเจนร้อยละ 8.7 (Muzzarelli, 1977) เป็นโพลิแซคคาไรด์สายตรง เป็นอนุพันธ์ของไคติน ได้มาจากการกำจัดหมู่อะซิติก(deacetylation)ของไคติน โดยหมู่อะซิติกของไคตินถูกแทนที่ด้วยอะตอมของไฮโดรเจนกลายเป็นหมู่เอมีน(-NH<sub>2</sub>) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2

จากการหายไปของหมู่อะซิติก ทำให้ไคโตซานมีส่วนของโมเลกุลที่พร้อมจะทำปฏิกิริยาอย่างว่องไวอยู่หลายหมู่ หมู่ที่เด่นๆ คือหมู่เอมีนในตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 หมู่แอลกอฮอล์

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

โครงสร้างทางเคมีของไคโตซานจัดเป็น โพลีเมอร์ชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดหนึ่ง ด้วยคุณสมบัติเป็น cationic substance เป็นสารย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ไม่เป็นสารพิษ นอกจากนี้โมเลกุลไคโตซานยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อโรคได้ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมากมายหลากหลายวัตถุประสงค์ ทั้งในทางด้านการแพทย์ เวชสำอาง สิ่งทอ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร วิศวกรรมชีวภาพ รวมถึงการบำบัดน้ำเสีย และการบำบัดโลหะหนักในน้ำ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส

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

## กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

กรรมวิธีการผลิตไคตินและไคโตซานมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งวิธีทางเคมีและทางชีวภาพซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้วิธีทางเคมีดังแสดงในภาพ 3 และวัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากกากของเหลือในอุตสาหกรรมอาหารทะเลเช่นแข็ง อาทิ เปลือกกุ้งหัวกุ้ง กระจงปู และแกนหมึก โดยสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไคตินและไคโตซานที่ได้มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (Species) ของสัตว์เหล่านี้รวมถึงกรรมวิธีการผลิตดังนั้นกระบวนการผลิตที่นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาผสมผสานกับกระบวนการผลิตทางเคมีจึงมีการพัฒนาขึ้นเพื่อให้ได้สมบัติของผลิตภัณฑ์ไคตินและไคโตซานตามต้องการและเหมาะสมกับการนำไปใช้

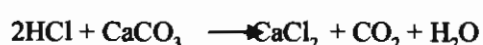
การผลิตไคตินและไคโตซาน ประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 1) กระบวนการกำจัดโปรตีน (Deproteinization)

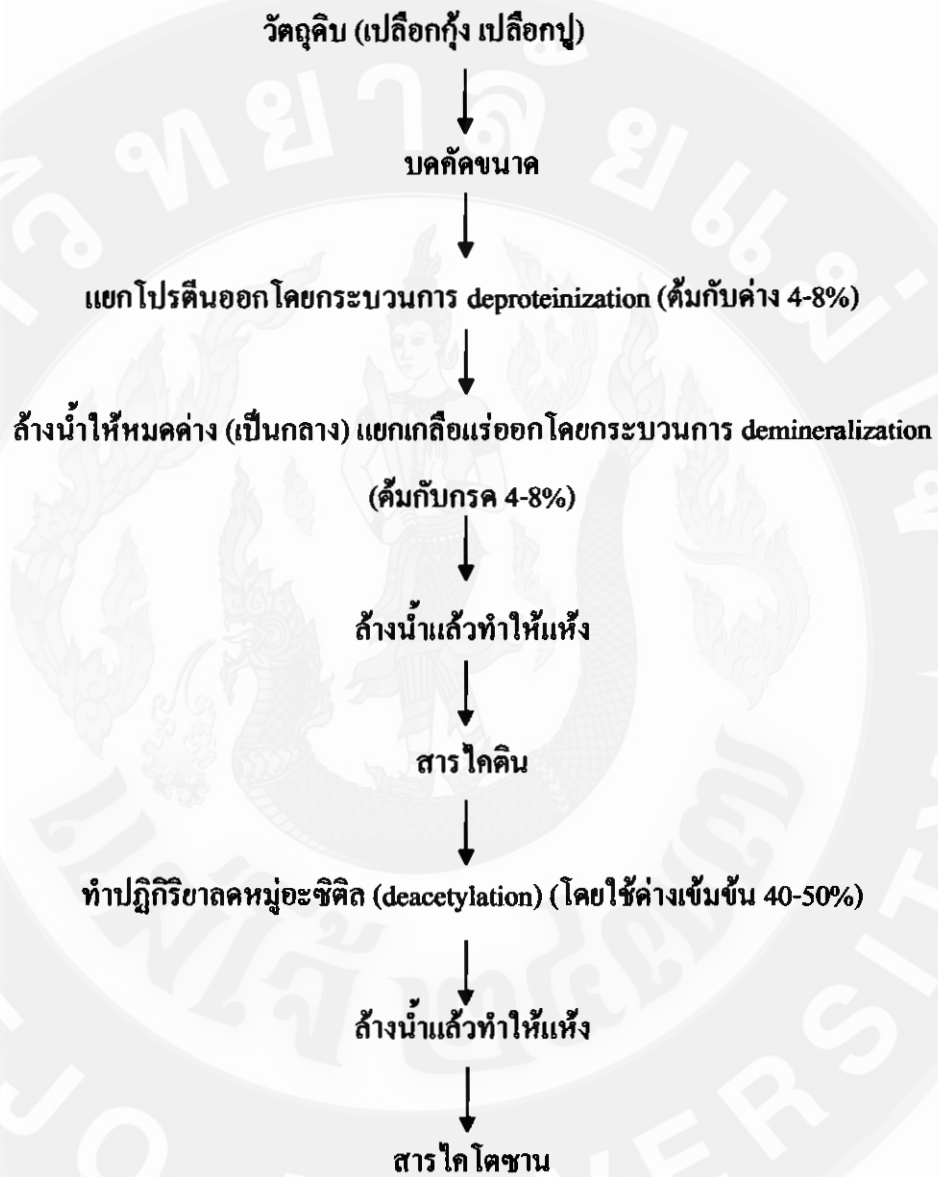
โดยการนำวัตถุดิบ ได้แก่ เปลือกกุ้ง เปลือกปู ฯลฯ มาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10% และอุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 65-100°C นอกจากนี้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา (reaction time) ขึ้นอยู่กับวิธีและสภาวะที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (No and Meyers, 1997) ในกระบวนการนี้โปรตีนส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไปจากวัตถุดิบซึ่งทำให้ไขมันบางส่วนและรงควัตถุบางชนิดมี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

### 2) กระบวนการกำจัดเกลือแร่ (Demineralization)

โดยการนำวัตถุดิบซึ่งผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนมาแล้ว มาทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจางที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกลือแร่ส่วนใหญ่ ได้แก่ หินปูน ( $\text{CaCO}_3$ ) ถูกเปลี่ยนเป็นเกลือที่ละลายน้ำ ( $\text{CaCl}_2$ ) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) ดังสมการที่ 1 และพร้อมกันนี้ทำให้บางส่วนของรงควัตถุและโปรตีนที่ละลายได้ในกรดขอมถูกกำจัดออกไปด้วยในขั้นตอนนี้ด้วยเช่นกัน วัสดุที่ได้หลังจากการกำจัดเกลือแร่คือ คือ ไคติน (Chitin)



สมการที่ 1

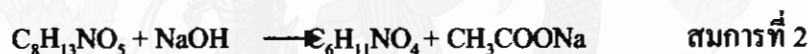


ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมไคตินและไคโตซาน

หากเปรียบเทียบวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโคตินระหว่างเปลือกทุและเปลือกกุ้งพบว่าการแยกแร่ธาตุออกจากเปลือกทุจะกระทำได้ง่ายกว่าเปลือกกุ้งและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ใช้ในการแยกแร่ธาตุไม่ควรน้อยกว่า 0.7 โมลาร์อย่างไรก็ตามการใช้กรดมากเกินไปจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานลดลง (Myint et al., 2002)

### 3) กระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติก(Deacetylation)

เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ใช้ในการกำจัดหรือลดหมู่อะซิติก เพื่อให้เกิดเป็นโคโคซาน ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโนบนโมเลกุลของโคติน ดังสมการที่ 2 และหมู่อะมิโนนี้มีความสามารถในการรับโปรตอนจากสารละลาย ซึ่งช่วยให้การละลายดีขึ้นเพราะมีสมบัติเป็นประจุบวก ส่วนใหญ่เมื่อปริมาณของหมู่อะซิติกถูกกำจัดไปมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สารโคโคซานที่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด อาทิเช่น กรดอะซิติก กรดแลกติก และกรดซิตริก เป็นต้น การลดหมู่อะซิติกกระทำโดยใช้ค่าที่เข้มข้นสูงตั้งแต่ 40 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ดังนั้น พารามิเตอร์ที่สำคัญในการพิจารณาสารโคโคซานก็คือ ค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (%DD) (สุวดี, 2542)



### คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโคติน-โคโคซาน

#### 1) การละลาย (Solubility)

โคตินจะไม่ละลายในน้ำ กรดเจือจาง ค่าทั้งเจือจาง และเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ความยากในการละลายของโคตินในตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นผลมาจากสายโซ่โมเลกุลที่อยู่กันอย่างหนาแน่นมีพันธะเกิดขึ้นทั้งภายใน และระหว่างโมเลกุล เนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกันคือ หมู่ไฮดรอกซิล และหมู่อะซิตามิโค

โคโคซานไม่ละลายน้ำ ค่า และตัวทำละลายอินทรีย์ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด กรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดไนตริก และ กรดไฮโดรคลอริก สามารถละลายโคโคซานได้เช่นกัน แต่ภายใต้อุณหภูมิที่สูงปานกลาง อย่างไรก็ตามบางครั้งอาจมีตะกอนขาวคล้ายเจลเกิดขึ้น (สุวบุญ และคณะ, 2544)

## 2)น้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight)

น้ำหนักโมเลกุลเป็นสมบัติที่สำคัญในการบอกสมบัติทั้งทางกายภาพ และทางเคมีของไคโตซาน โดยทั่วไปไคตินในธรรมชาติจะมีน้ำหนัก โมเลกุลสูงมากกว่า  $1 \times 10^6$  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 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกต่ำจะแสดงสมบัติเค้นของไคติน ถ้าสัดส่วนของมอนอเมอร์หลังมากกว่าจะมีค่า ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกสูงจะแสดงสมบัติเค้นของไคโตซาน 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 เนื่องจากการมีหมู่เอมิโนจำนวนมากที่สามารถแตกตัวเป็นประจุบวก และจับกับสารที่มีประจุลบได้ เช่น โปรตีน สีข้อม และพอลิเมอร์อื่น จากการวิจัยประสิทธิภาพของไคโตซานในการแยกโปรตีนออก

จาก cheese whey พบว่าความสามารถในการจับโปรตีนเป็นสัดส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถจับโลหะหนักได้ โดยไนโตรเจนในหมู่อะมิโนของไคโตซานจะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้อิออนของโลหะสามารถสร้างพันธะเชิงซ้อน (coordinate) กับหมู่อะมิโนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่อะมิโนของไคโตซานมีประสิทธิภาพในการจับกับไอออนของโลหะได้ดีกว่าหมู่อะซิดิลในไคติน ดังนั้นไคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิดิล (%DD) สูงจะมีอัตราการดูดซับหรือความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะสูง ความสามารถในการดูดซับไอออนของโลหะของไคโตซานยังขึ้นอยู่กับอีกหลายปัจจัย เช่น ความเป็นผลึก และความสามารถในการคั่งคูลน้ำของไคโตซาน (Li et al., 1992)

#### 6) Molecular conformation

ไคตินมีโครงสร้างของผลึก (crystal structure) ที่แข็งแรงและมีระดับของผลึก (degree of crystallinity) สูง รูปแบบผลึกของไคตินมี 3 ลักษณะ คือ  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin และ  $\gamma$ -chitin แต่ละลักษณะแตกต่างกันที่การเกิดระบบของผลึก (crystal system) และปัจจัยของการเกิดแลตติซผลึก (crystal lattice) ของหน่วยเซลล์ (unit cell) ภายในโครงสร้างผลึก ความแตกต่างนั้นเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลในแลตติซผลึก สายโซ่โมเลกุลที่ยาวของไคตินจะมีการเรียงตัวเป็นแผ่นซ้อนทับกัน (pleated sheet) ในแลตติซผลึกของหน่วยเซลล์ ซึ่งอาจเรียงตัวกันได้ 2 แบบ คือ แบบขนานที่มุ่งไปในทิศทางเดียวกัน (parallel pattern) และแบบที่โครงสร้างเรียงตัวกันแบบสวนทางกัน (anti-parallel pattern)  $\alpha$ -chitin มีโครงสร้างการเรียงตัวแบบสวนทางกัน พบในไคตินของเปลือกกุ้ง และปู ส่วนไคตินที่พบในแกนปลาหมึกจะมีโครงสร้างที่เรียงตัวมุ่งไปในทิศทางเดียวกัน เกิดเป็น  $\beta$ -chitin การจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลแบบ  $\gamma$ -chitin นั้นเกิดจากโครงสร้างเรียงสลับกันระหว่างสองแบบที่กล่าวมาแล้ว

โดยธรรมชาติจะพบ  $\alpha$ -chitin ของไคตินมากกว่า  $\beta$ -chitin และ  $\gamma$ -chitin ทั้งนี้เพราะมีการเกิดพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular และ intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี (chemical stability) มากกว่าแบบอื่น  $\beta$ -chitin มีเสถียรภาพทางเคมีรองลงมาจก  $\alpha$ -chitin ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า การมีเสถียรภาพที่น้อยทำให้มันมีโอกาสเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโครงสร้างจาก  $\beta$ -form เป็น  $\alpha$ -form ใน

สารละลายกรดแก่ นอกจากนี้ยังมีโอกาสจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวร เป็นโคคินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ได้อีกทางหนึ่ง

โคโคซานเป็นพอลิอิเล็กโตรไลต์ประเภทบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากในสารละลายกรดหมู่เอมิโนในสายโซ่โมเลกุลจะรับโปรตอน 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)

โคคิน-โคโคซานก็เหมือนกับพอลิเมอร์หรือพอลิแซคคาไรด์อื่นทั่วไป คือเมื่อเกิดการเสื่อมสลายจะให้สายโซ่โมเลกุลที่สั้นลงเป็น โอลิโกเมอร์ (oligomer) หรือ โอลิโกแซคคาไรด์ไรด์ (oligosaccharide) และเป็นหน่วยย่อยที่เล็กที่สุดที่เรียกว่ามโนเมอร์ (monomer) หรือมโนแซคคาไรด์ไรด์ (monosaccharide)

โอลิโกเมอร์ โอลิโกแซคคาไรด์ไรด์ของโคคินและโคโคซาน คือ *N*-acetylchitooligosaccharide และ chitooligosaccharides ตามลำดับ ส่วนมโนเมอร์ มโนแซคคาไรด์ไรด์ของโคคินและโคโคซานคือ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ตามลำดับ

##### 7.1) การเสื่อมสลายโดยกรด (acid hydrolysis)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของโคโคซานเนื่องจากกรดเป็นแบบสุ่ม (random) ผลึกษณ์ที่ได้คือ โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และมโนเมอร์ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของพอลิเมอร์ โดยโคคินจะสามารถต้านทานต่อการเสื่อมสลายโดยกรดได้ดีกว่าโคโคซาน

##### 7.2) การเสื่อมสลายโดยด่าง (alkaline degradation)

การเสื่อมสลายของสายโซ่โมเลกุลของ โพลีแซคคาไรด์ในค้างจะเริ่มจากปลายสุดของสายโซ่โมเลกุล การเสื่อมสลายแบบนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า peeling reaction

#### 7.3) การเสื่อมสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียง (Degradation by sonication)

การเสื่อมสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียงควบคู่กับการใช้กรด มีผลให้ได้โอลิโกเมอร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าการเสื่อมสลายโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว

#### 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) โคลโคซานจะไม่สามารถละลาย หลังจากการอบที่อุณหภูมิ 115 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหลังการอบที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 120 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การอบที่อุณหภูมिन้อยกว่าหรือเท่ากับ 120 °C ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ต่อสมบัติทางกายภาพของโคลโคซาน (Lim et al, 1999)

### 8) ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา

โคลโคซานประกอบด้วย 3 หมู่ฟังก์ชันที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา คือหมู่เอมีโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง (C-2) หมู่ Primary Alcohol ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่หก (C-6) และหมู่ Secondary Alcohol ( $\text{CHOH}$ ) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สาม (C-3) การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมี (Chemical Modification) ของทั้งสามหมู่ฟังก์ชันนี้สามารถก่อให้เกิดวัสดุต่างๆ ในการใช้งานที่แตกต่างกัน (ภาวดี และคณะ, 2543) การนำไปใช้งานนี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมี และกายภาพ ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่เอซิดิลความชื้นปริมาณได้ ปริมาณโปรตีน ความหนืด และน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น

### สมบัติที่สำคัญของโคติน-โคลโคซาน

สมบัติที่สำคัญของชาติโคติน-โคลโคซาน 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. โคลโคซานเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก (Positive Charge) สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับของแข็งอินทรีย์ (Organic Solid) และพื้นผิวเซลล์ (Cell Surface) ที่มีประจุลบ ดังนั้นจึงนิยมประยุกต์ใช้โคลโคซานในอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย (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) เป็นฟิล์มจะใช้ในงานด้านตกแต่งบาดแผลเป็นสารเคลือบโคอะไลซีสมมเบรน (Dialysis Membrane) เป็นต้น (Shigemasa et al. 1998)

### การวิเคราะห์คุณภาพโคโคซาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์มาตรฐานของโคโคซาน ตั้งแต่เป็นวัตถุดิบ โดยนำโคโคซานที่อยู่ในรูปผงมาทำการละลายในกรดอินทรีย์เข้มข้น 1% จนละลายหมด แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าคุณสมบัติดังนี้

1. ค่าการกำจัดหมู่อะซิติก (Degree of Deacetylation, %DD) จะเป็นตัวชี้ว่าสารที่นำมาวิเคราะห์มีคุณสมบัติความเป็นโคโคซานมากน้อยแค่ไหน โดยพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์ของ กำจัดหมู่อะซิติก 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 เจลเพอร์มิเอชัน โครมาโตกราฟี เป็นต้น

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

## 2. การสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน

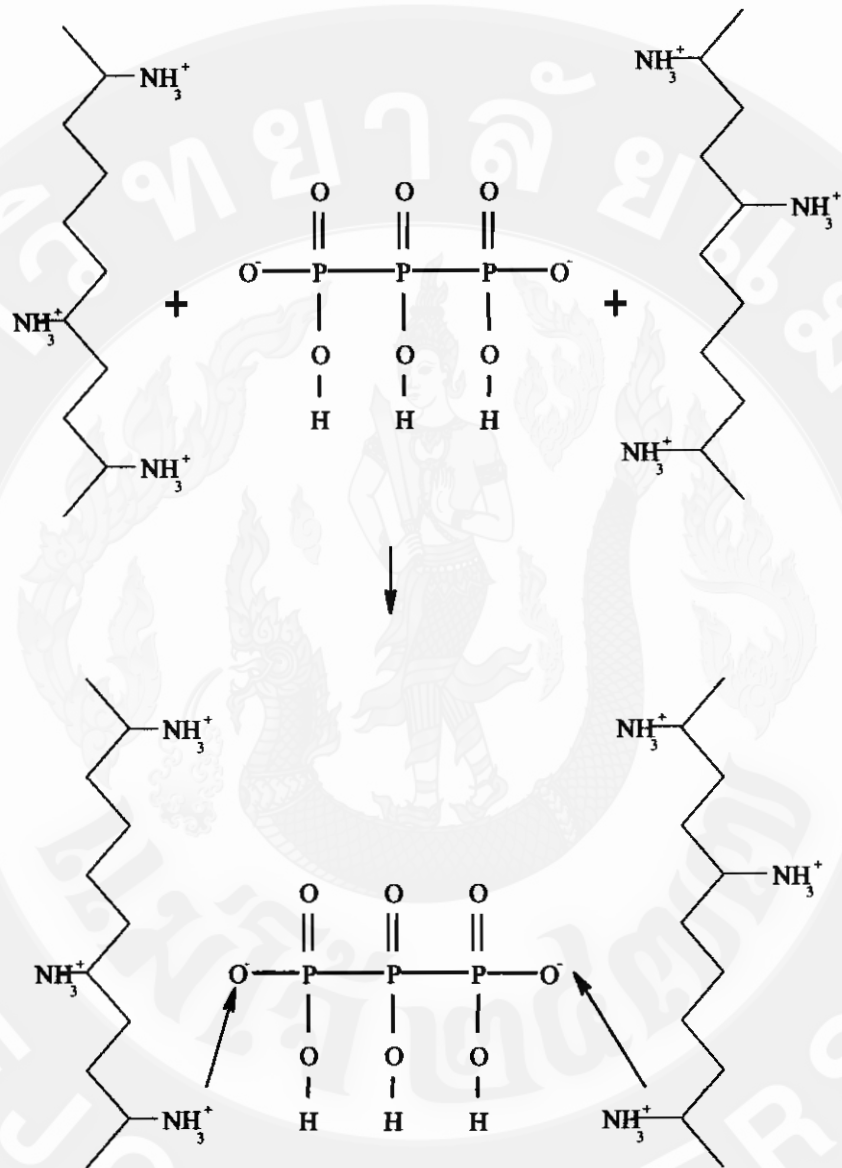
ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนไคโตซานมีหลายวิธี สำหรับการวิจัยนี้ใช้ 2 วิธี ได้แก่

### 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 เทคนิคไอออนิกเจลเลชันเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้เตรียม polymeric nanoparticles เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกเครื่องมือที่ใช้ไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีปัจจัยต่างๆ มากมายที่ต้องศึกษาหรือควบคุม เช่น ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ สัดส่วนของพอลิเมอร์ที่ใช้ ชนิดของพอลิเมอร์ อัตราเร็วในการกวน และ ขนาดของเข็มที่ใช้หยดสารละลาย เป็นต้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาคที่เตรียมขึ้นได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียม polymeric nanoparticles



ภาพ 3 การเชื่อมโยงพันธะไอออนิกระหว่างหมู่ฟอสเฟตไอออนของโซเดียมไตรฟอสเฟต  
กับหมู่แอมโมเนียมไอออนของไคโตซาน

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) นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ไคโตซานผสมในอาหารสำหรับกับไก่เนื้อ (ปิยะบุตร และสุวดี, 2543) และเป็ดเนื้อ (ปิยะบุตร และคณะ, 2543) ซึ่งมีผลทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตดี ขนสวย สุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์กว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้ไคโตซาน

#### 2) ด้านเส้นใยและสิ่งทอ

ไคตินและไคโตซานสามารถนำไปใช้ผลิตเป็นเส้นใยและเส้นด้าย ใช้เป็นสารตกแต่งสำเร็จสิ่งทอ (Textile finishing agent) นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีนำไคโตซานไปเคลือบลงบนเส้นใยหรือเส้นด้ายชนิดอื่น เช่น เตรียมเส้นด้ายฝ้ายที่เคลือบด้วยไคโตซาน (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 ไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงๆ เช่น 95-98% DD มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้จาก 5 วัน เป็น 9 วัน นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในเครื่องปรุงรสอาหาร เช่น ซอิ๊ว เป็นต้น ไคโตซานยังถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในกระบวนการผลิตอาหารและเครื่องสำอางค์หลายชนิด และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ จึงมีการผลิตเพื่อนำมาใช้เป็นฟิล์มห่อหุ้มเพื่อถนอมอาหาร

#### 4) ด้านการบำบัดน้ำ

ไคโตซานมีประจุเป็นบวกและมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ผสม (heteropolymer) ของ D - glucosamine และ N-acetyl-glucosamine ซึ่งสามารถดักจับ คูลจับไขมัน และโลหะหนักต่างๆ ได้ เช่น สารหนู แคดเมียม ทองแดง ตะกั่ว ปรอท สังกะสี นิกเกิล 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 ทำให้น้ำในบ่อมีคุณภาพดีขึ้นและส่งผลให้ได้ผลผลิตกุ้งปริมาณมากขึ้นและมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงขึ้น (Wanichpongpan และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกเป็นจำนวนมากที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ไคติน-ไคโตซานเป็นตัวจับไอออนโลหะในน้ำทิ้ง เช่น ไอออนของปรอท ทองแดง ตะกั่ว แคดเมียม เป็นต้น (Felse and Panda, 1999)

#### 5) ด้านเครื่องสำอาง

ไคโตซานเป็นสารประเภท non-toxic polyelectrolyte ที่มีประโชยน์ต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทั้งนี้เพราะ ประจุบวกของหมู่แอมโมเนียม ( $-NH_3^+$ ) ที่เรียงรายอยู่บนโครงสร้างของไคโตซานจะมีความว่องไวต่อการจับกับผิวหนังและเส้นผมที่ประกอบด้วยสาร mucopolysaccharides โปรตีน และไขมัน ที่มีประจุลบได้เป็นอย่างดี ไคโตซานที่เคลือบอยู่นี้จะก่อตัวเป็นฟิล์มบางๆ พร้อมกับดูดซับความชื้นและไขมันเอาไว้ จึงช่วยรักษาความชุ่มชื้น และความยืดหยุ่นให้แก่ผิวหนังและเส้นผม และนอกเหนือจากสมบัติในการช่วยยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและลดอาการระคายเคืองหรือคันศีรษะแล้ว อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง พอลิแซ็กคาไรด์ และ โปรตีนของเส้นผมยังมีส่วนในการเพิ่มความเงางามให้แก่เส้นผมอีกด้วย (Dunn et al., 1997) ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารไคติน-ไคโตซาน ได้แก่ ครีม และ โลชั่นบำรุงผิว แชมพู โลชั่นบำรุงผม แป้ง แต่งหน้า ยาทาเล็บ 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) และ เจล (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 ด้วยการติดพันเข้าจุก (Borges et al., 2006; Amidi et al., 2007) และด้วยการติดเข้ากล้ามเนื้อ (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 เท่าเมื่อไว้สำหรับการสูญเสียดังกล่าว 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 ของไมโครออลจี *Haematococcus pluvaelis* เคลือบโคโตซาน เพื่อรักษารังควัตถุแดง astaxanthin ได้นานถึง 24 สัปดาห์ (Kittikaiwan et al., 2007)

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

จะเห็นได้ว่า เทคโนโลยีของอนุภาคนาโนโคโตซานกำลังถูกพัฒนาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน แต่การศึกษาวิจัยด้านการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังมีน้อยมาก และยังไม่มียุทธศาสตร์การศึกษาวิจัยในระดับอนุภาคนาโนชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย ทั้งที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ เป็นแหล่งผลิตโปรตีนคุณภาพสูงที่มีราคาไม่แพง เช่น ปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ 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 (homogenizer) ที่ความเร็วรอบ 16,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีจากนั้นค่อยๆหยดสารละลาย TPP เข้มข้น 0.5 %w/v (40 ml) แล้วกวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนหรืออนุภาคที่ก่อตัวขึ้นออกจากส่วนที่เป็นของเหลว ล้างอนุภาคด้วยสารละลายสารลดแรงดึงผิว 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)

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

### 2.2 Transmission electron microscope (TEM)

ทำได้โดยนำ copper grid ไปแตะบนหยดของเหลว สารตัวอย่างจะกระจายตัวในน้ำ จากนั้นซับสารตัวอย่างที่มากเกินไปออกจากกริด โดยใช้กระดาษกรอง ทำแห้งในระบบสุญญากาศเป็นเวลา 1-2 วัน แล้วนำไปตรวจสอบ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน [JEOL รุ่น JEM - 1220]

### 2.3 Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR)

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

### 2.4 การวัดขนาดของอนุภาคนาโนโคโคซาน

นำเจลอนุภาคนาโนโคโคซานมาทำแห้งด้วยระบบ 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% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10H<sub>2</sub>O 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% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10H<sub>2</sub>
- 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  $1 \times 10^5$   $1 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^7$  cfu/ 1 ตัวปลา และให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดสมุนไพร 0.1% หลังฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง

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

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



## ผลการวิจัย อภิปราย และวิจารณ์

### 1. การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซาน

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

ตารางที่ 1 ความบริสุทธิ์ (%DD) และขนาดของโมเลกุล โคโคซาน (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

ได้เตรียมอนุภาคนาโนโคโคซาน-TPP(CS-TPP)ด้วยวิธี ionic gelation ที่ความเข้มข้นของโคโคซาน สังเกตเห็นว่าสารละลายที่ได้ใสขึ้นแบบเจล (ภาพที่ 4)

ดังนั้น การวิจัยนี้ใช้โคโคซาน 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

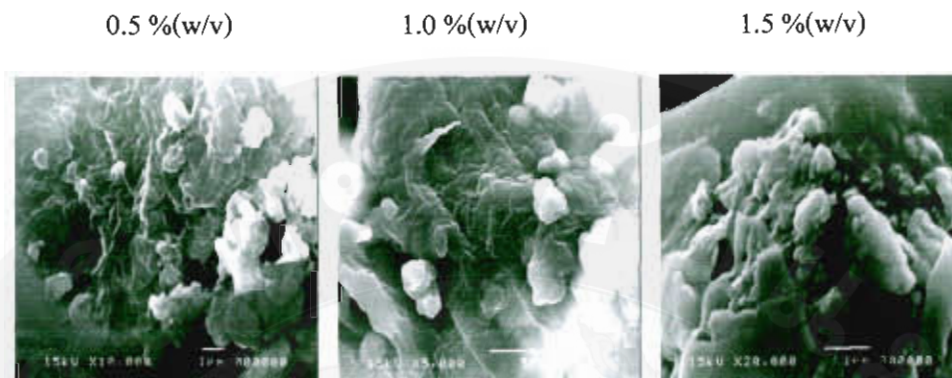
ภาพที่ 4 เจลของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่าด้วยวิธีไมโครอิมัลชันและไอออนิกเจลชัน

### 1.1 อนุภาคนาโนไคโตซาน-ไตรโพลีฟอสเฟต โดยวิธีไมโครอิมัลชัน

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



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-ไทรโพลิฟอสเฟต โดยวิธีไอออนิกเจลเลชัน

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

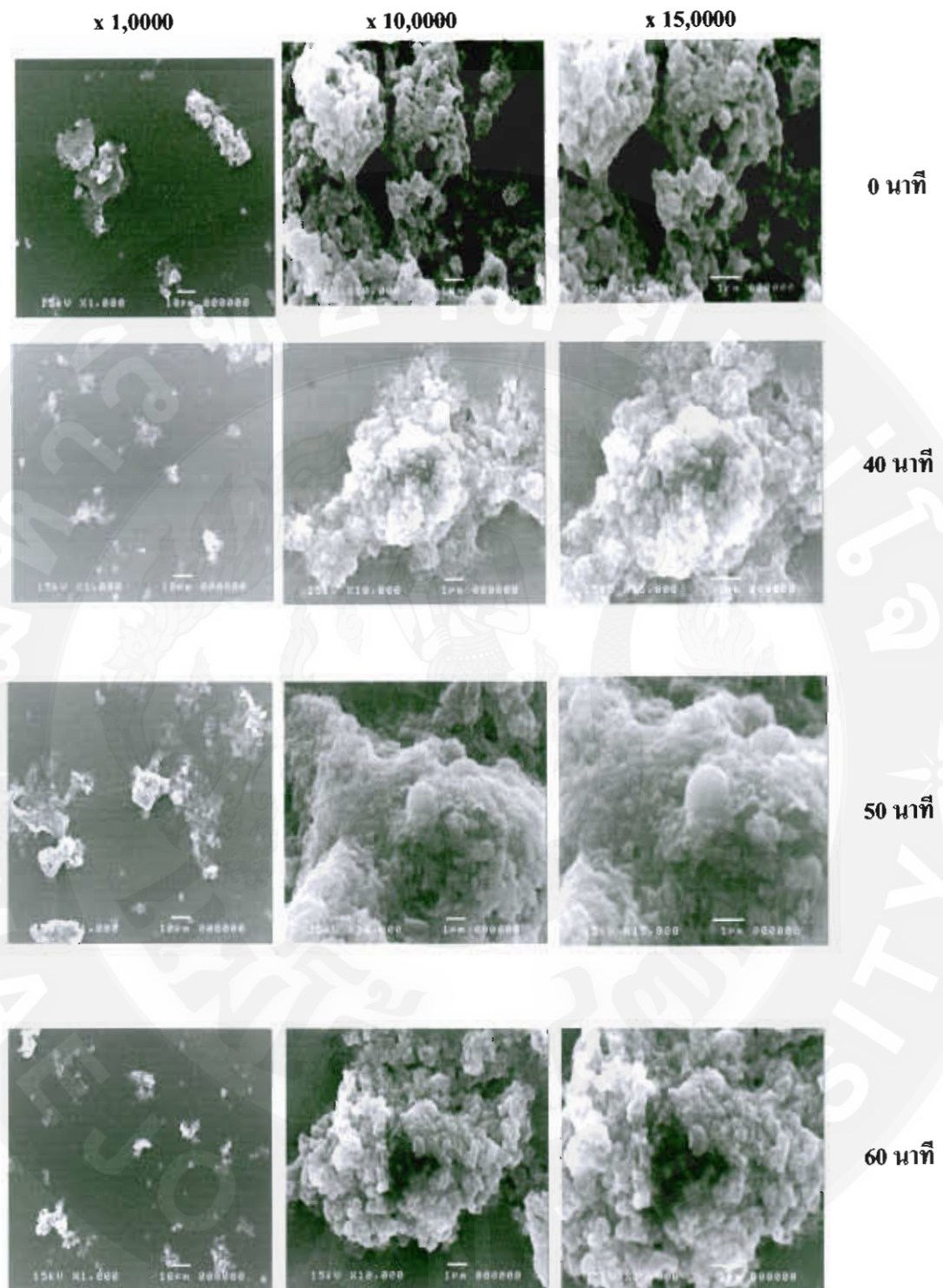
พบว่าการใช้ไคโตซาน 85 %DD ขนาดโมเลกุล 80 KDa ความเข้มข้น 0.5% w/v จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีลักษณะเป็นเจลใสและเมื่อนำตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วยกล้อง SEM พบว่าได้อนุภาคนาโนไคโตซานมีรูปร่างค่อนข้างกลม มีการเกาะกลุ่มกันมากและขนาดอนุภาคมีขนาดเล็ก และเมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย TEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะกลม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

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

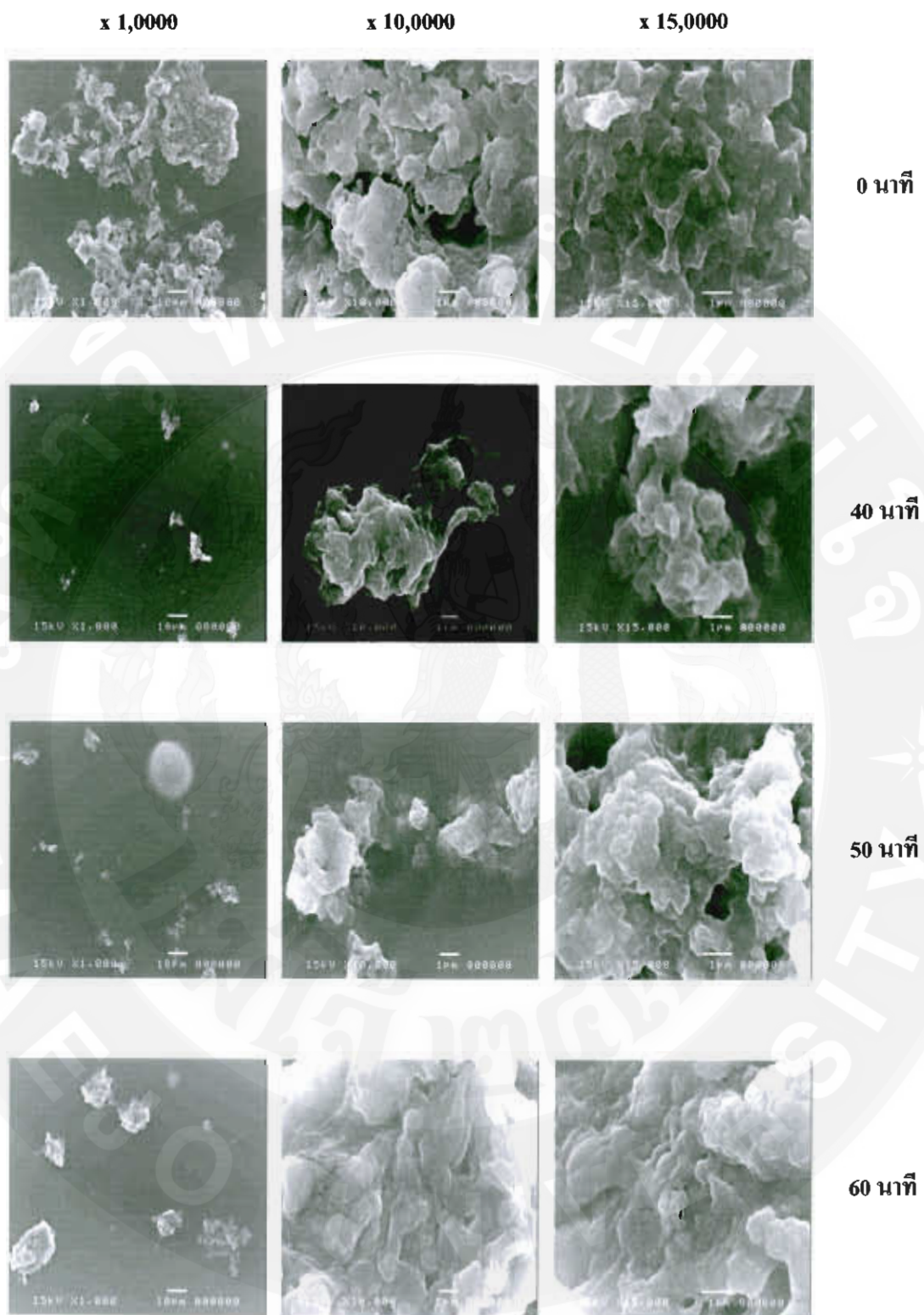
ส่วนการใช้ไคโตซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa และ 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 85 %DD ซึ่งอาจเกิดจากผลของน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงทำให้ได้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่ตามไปด้วย ส่วนผลของความเข้มข้นของไคโตซานนั้นมีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะทำให้ได้อนุภาคที่ใหญ่ขึ้นตามไปด้วย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

จากผลการทดลองสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า พบว่า การสร้างอนุภาคนาโนด้วยวิธีไมโครอิมัลชันให้อนุภาคนาโนที่เป็นผงได้ง่ายกว่าวิธีไอโอโนโทรปิกเจเลชัน แต่วิธีไมโครอิมัลชันมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่า และยังคงมีขั้นตอนการกำจัดน้ำมันโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งมีโอกาสตกค้างในอนุภาคนาโนที่เตรียมได้

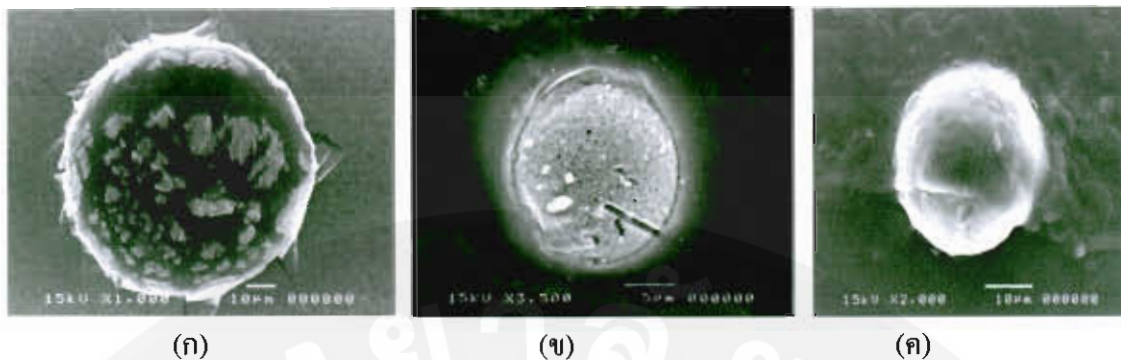
ดังนั้น เทคนิคไอโอโนโทรปิกเจเลชันเป็นวิธีการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซานที่เหมาะสมในงานวิจัย โดยการใช้ไคโตซาน 96.85 %DD (วัดได้ 81.45 %DD) ขนาดโมเลกุลที่วัดได้ 139kDa และใช้ TPP 1 mg/ml ในอัตราส่วนปริมาตร 2 : 1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 0.2 % จะได้อนุภาคนาโนไคโตซานที่มีขนาดเล็กที่สุด 183.50 nm ดังนั้นในการทดลองขั้นตอนต่อไปจึงใช้ความเข้มข้นและอัตราส่วนนี้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



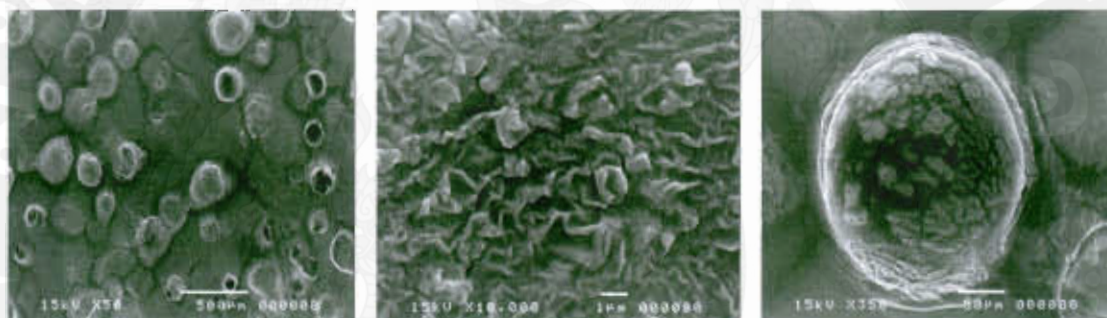
ภาพที่ 6 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ



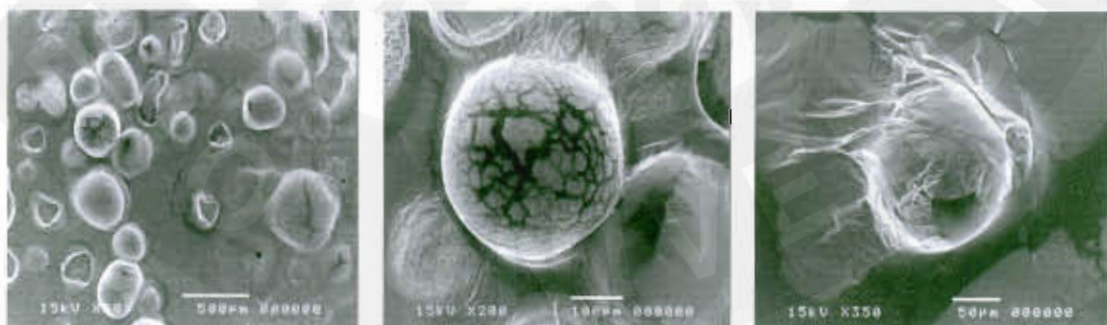
ภาพที่ 7 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้ ไคโตซานขนาด 290 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate ที่เวลาต่างๆ



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



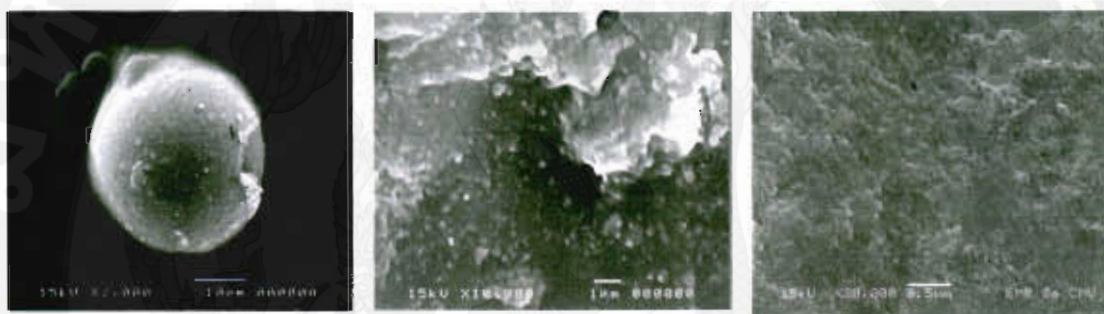
ภาพที่ 9 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.2 % (w/v) และเติม trehalose 1%



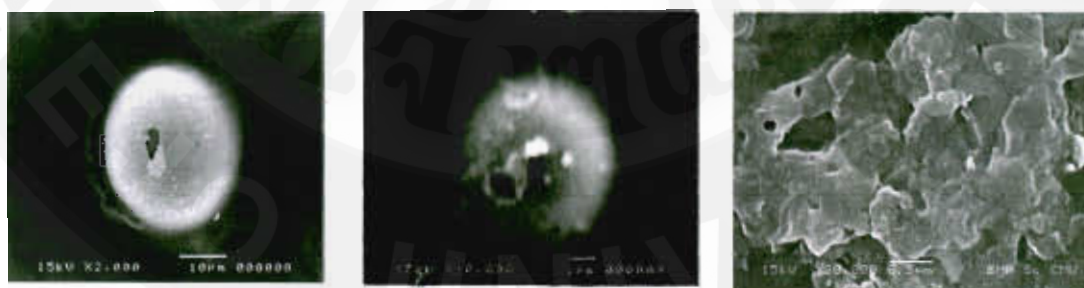
ภาพที่ 10 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 1,500 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



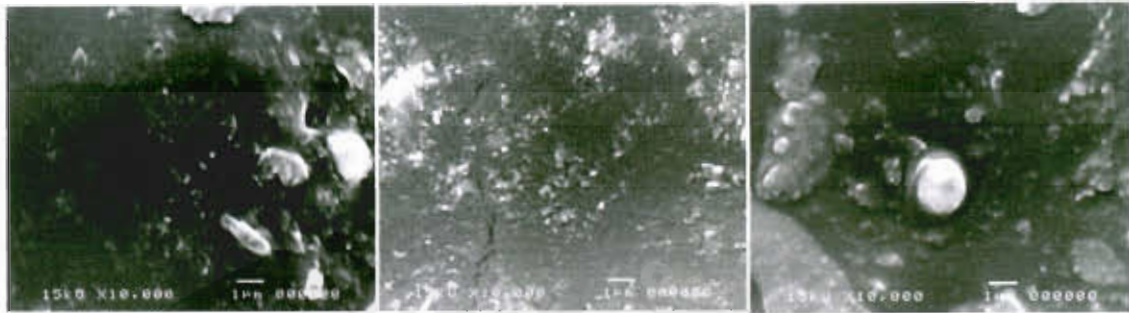
ภาพที่ 11 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่กำลังขยายต่างๆ โดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 95 %DD ขนาดโมเลกุล 200 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



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



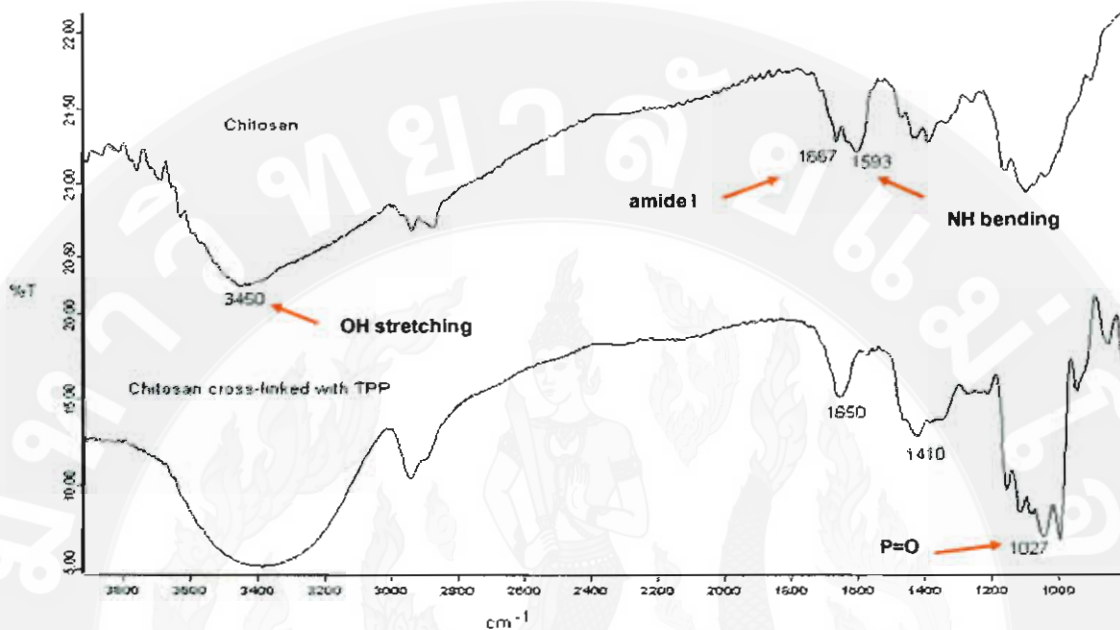
ภาพที่ 13 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานโดยได้จากการเตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจลชัน ใช้ไคโตซาน 90 %DD ขนาดโมเลกุล 150 kDa ที่ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) และเติม trehalose 1%



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%



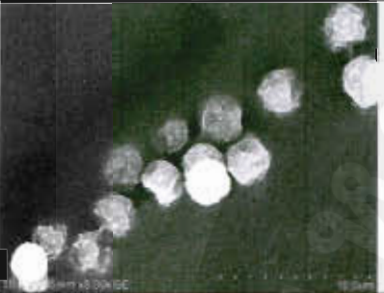
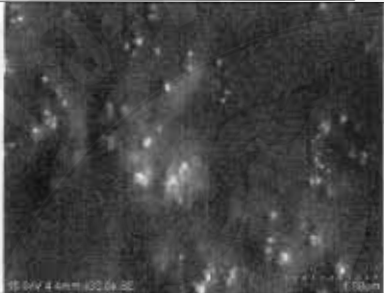
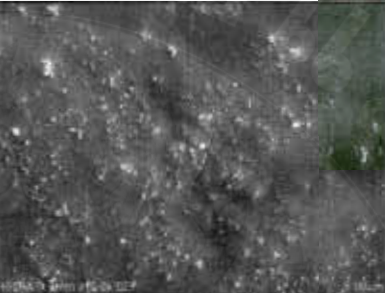

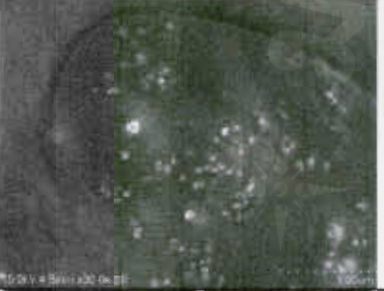
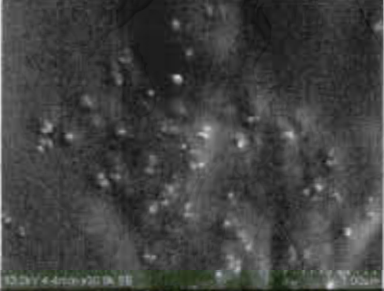
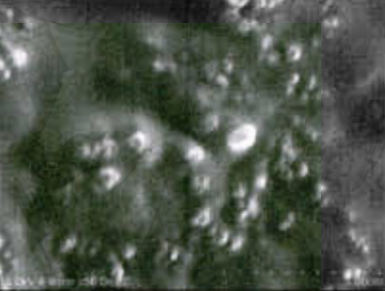
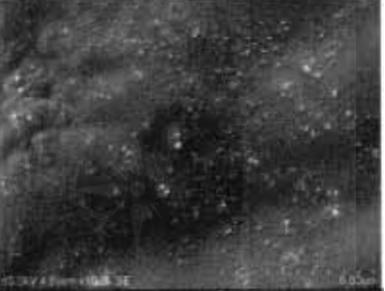
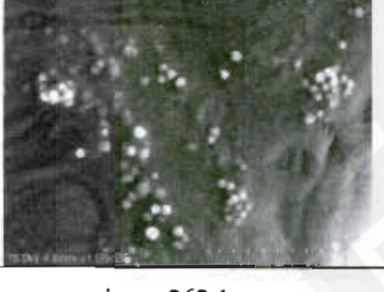
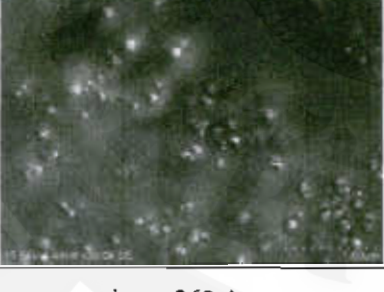


ภาพที่ 16 FTIR spectra ของไคโตซานและอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

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. อนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพร

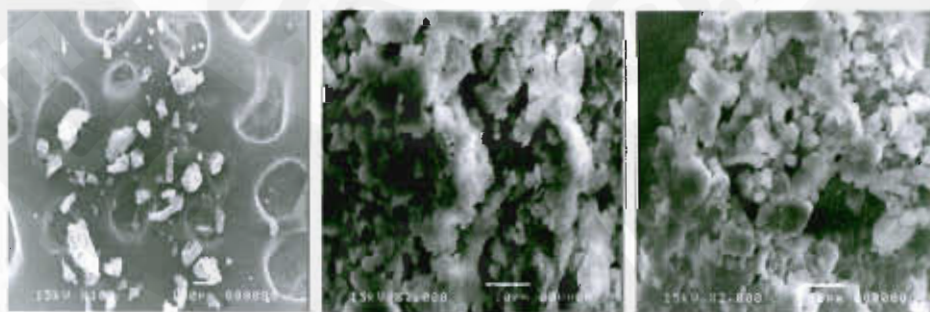
### 2.1 ประสิทธิภาพการบรรจุ

#### 2.1.1 การเตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน

ทำการสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน โดยการเติมสารลดแรงตึงผิวที่ทำการ sonicate 60 นาที เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย SEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะค่อนข้างเป็นเหลี่ยม ขนาดไม่สม่ำเสมอ มีการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน อาจเนื่องมาจากสารสกัดสมุนไพรเข้าไปอยู่ในอนุภาคนาโนโคโคซาน อนุภาคนาโนโคโคซาน - สารสกัดสมุนไพรที่เห็นมีขนาดอยู่ในช่วง 1-10  $\mu\text{m}$  (ภาพที่ 18)

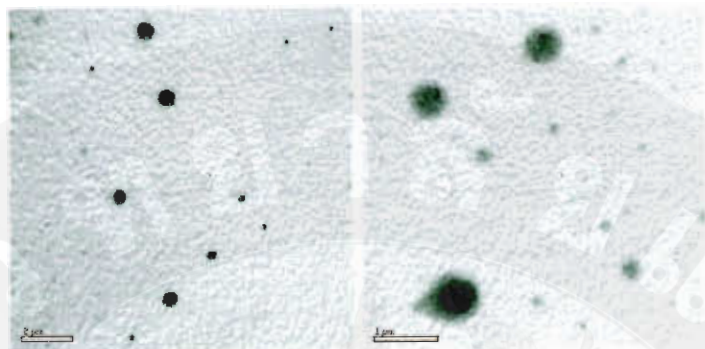
เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างด้วย TEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะกลม และมีขนาดในระดับนาโนเมตร ขนาดประมาณ 160-860 nm ในขณะที่อนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรมีขนาดประมาณ 220-880 nm (ภาพที่ 19) ซึ่งใหญ่กว่าอนุภาคนาโนโคโคซานเปล่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนโคโคซาน

นำอนุภาคนาโนโคโคซานที่ได้ไปพิสูจน์การบรรจุสาร โดยใช้เทคนิค FTIR พบว่ามีการบรรจุสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนโคโคซานจริง (ภาพที่ 20)

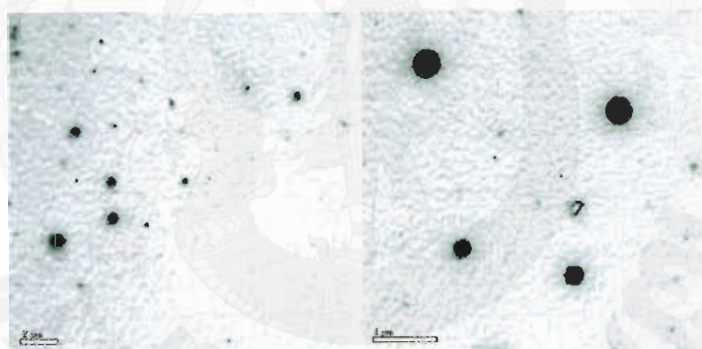


ภาพที่ 18 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน จากการใช้โคโคซานขนาด 20 kDa ที่ความเข้มข้น 1.5% w/v และ sonicate 60 นาที

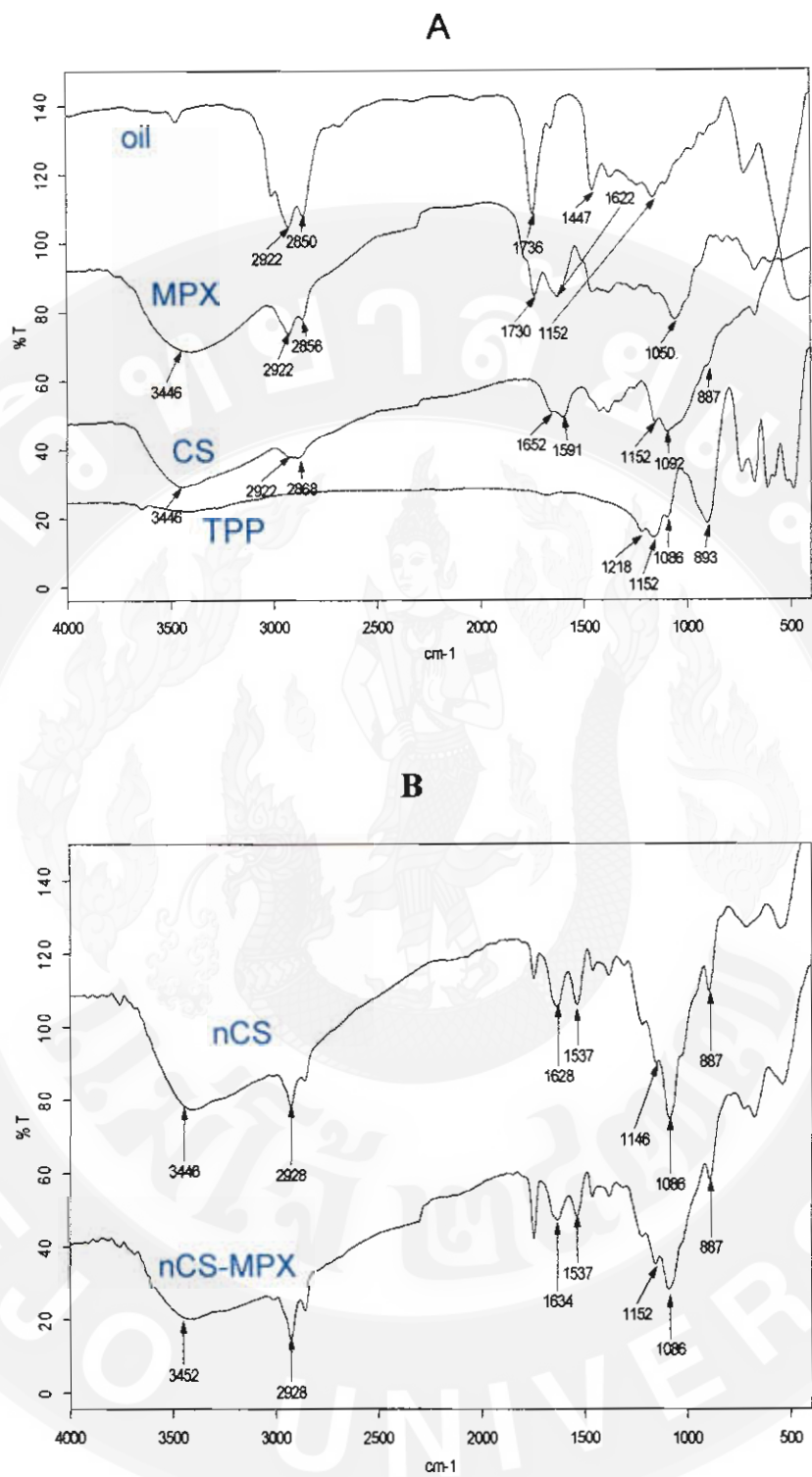
อนุภาคนาโนโคโคซานเปล่า



อนุภาคนาโนโคโคซาน - สารสกัดใบหูกวาง



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

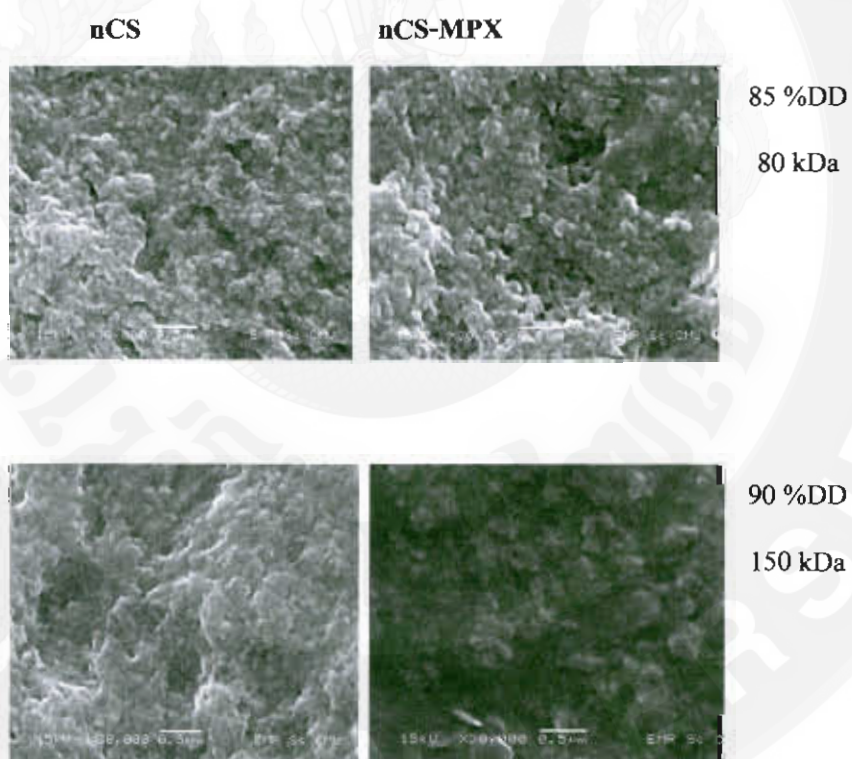
ได้ทำการสร้างอนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี ionic gelation และนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค SEM และ TEM จากภาพ electron-micrographs คาดว่าอนุภาคนาโนไคโตซานสามารถบรรจุสารสกัดสมุนไพรได้แต่ขนาดของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า และบรรจุสารสกัดไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 3 ขนาดของอนุภาคนาโนไคโตซานที่วัดด้วยวิธีnanosizer โดยใช้ไคโตซาน 96.85 %DD ที่ความเข้มข้น 0.2 % บรรจุด้วยสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ

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



ภาพที่ 21 เจลของอนุภาคนาโนไคโตซานเปล้าและบรรจุสารสกัดสมุนไพร

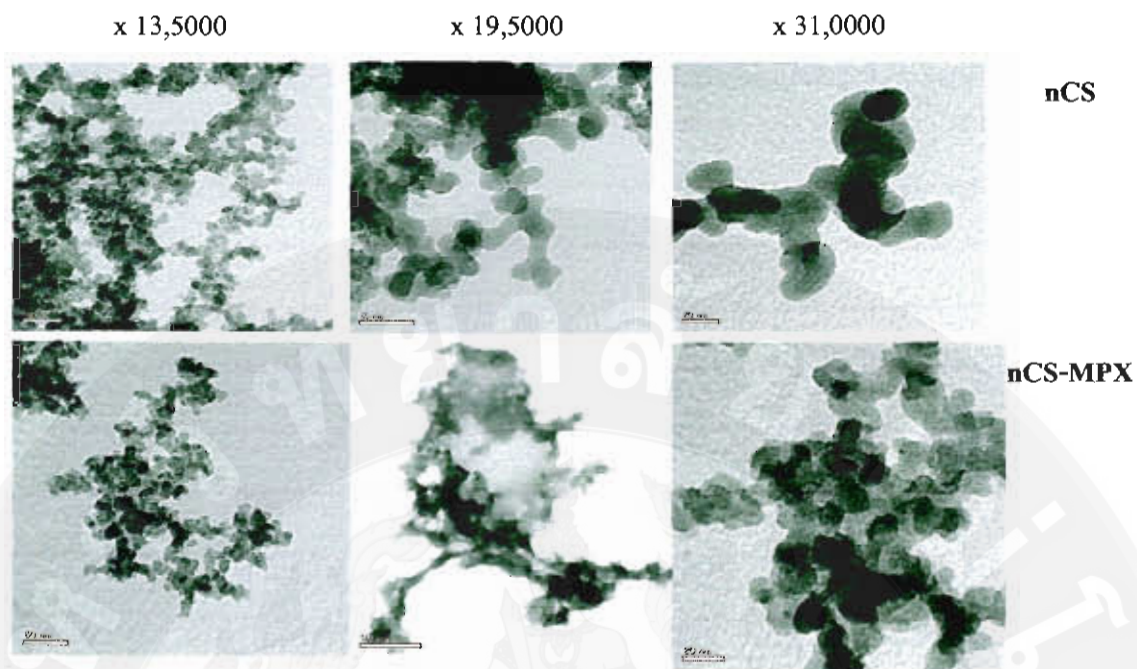


ภาพที่ 22 SEM micrographs ของอนุภาคนาโนไคโตซานที่เตรียมด้วยวิธีไอออนิกเจเลชัน โดยใช้

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

nCS = อนุภาคนาโนไคโตซานเปล้า

nCS-MPX = อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร



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

nCS = อนุภาคนาโนไคโตซานเปล่า

nCS-MPX = อนุภาคนาโนไคโตซาน-สารสกัดสมุนไพร

## 2.2 ประสิทธิภาพการบรรจุ(encapsulation efficiency)

จากการทดสอบบรรจุสารสกัดสมุนไพรในอนุภาคนาโนโคโคซานด้วยวิธีไอออนิกเจเลชัน 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%

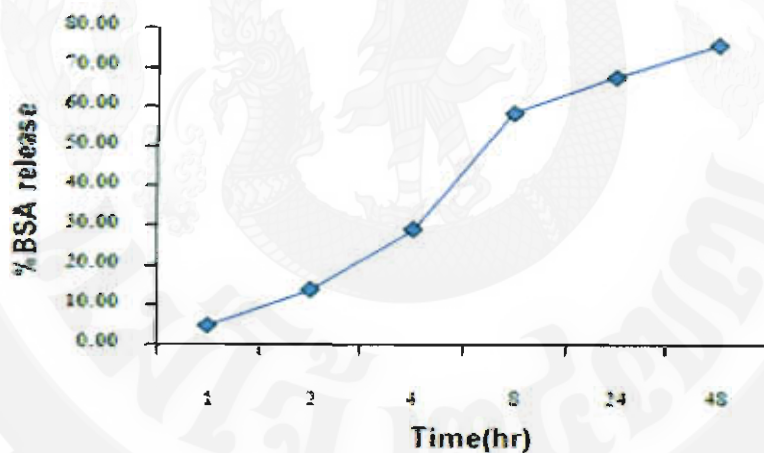
ตารางที่ 4อนุภาคนาโนโคโคซาน-สารสกัดสมุนไพรที่เตรียมได้

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

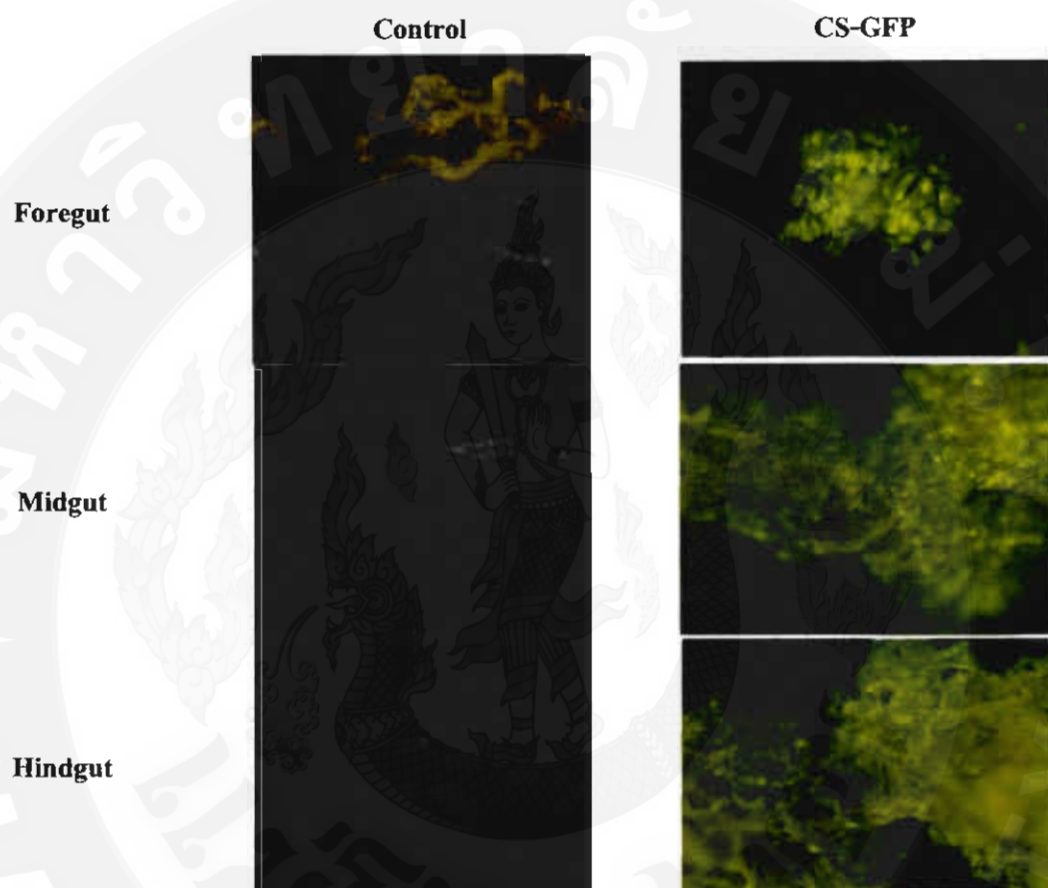
#### (In vivo releasing efficiency)

##### 3.1 การย่อยอนุภาคนาโนในโคโคซานลำไส้กุ้งก้ามกราม

ให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) โดยใช้กุ้งก้ามกราม 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 ทำการทดลองเช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม พบว่า อนุภาคนาโนโคโคซานสามารถถูกย่อยได้ ที่เวลา 15 นาที โดยเริ่มต้นที่ลำไส้ส่วนหน้า ดังภาพที่ 29-32 เช่นเดียวกับกุ้งก้ามกราม แต่การเรืองแสงของโปรตีน GFP ในปลานิลไม่ชัดเจนเท่ากับในกุ้ง อาจเนื่องมาจากอาหารปลานิลมีเส้นใยสูง โมเลกุลของโปรตีน GFP เข้าเกาะฝังอยู่ได้ ทำให้บดบังการเรืองแสงได้

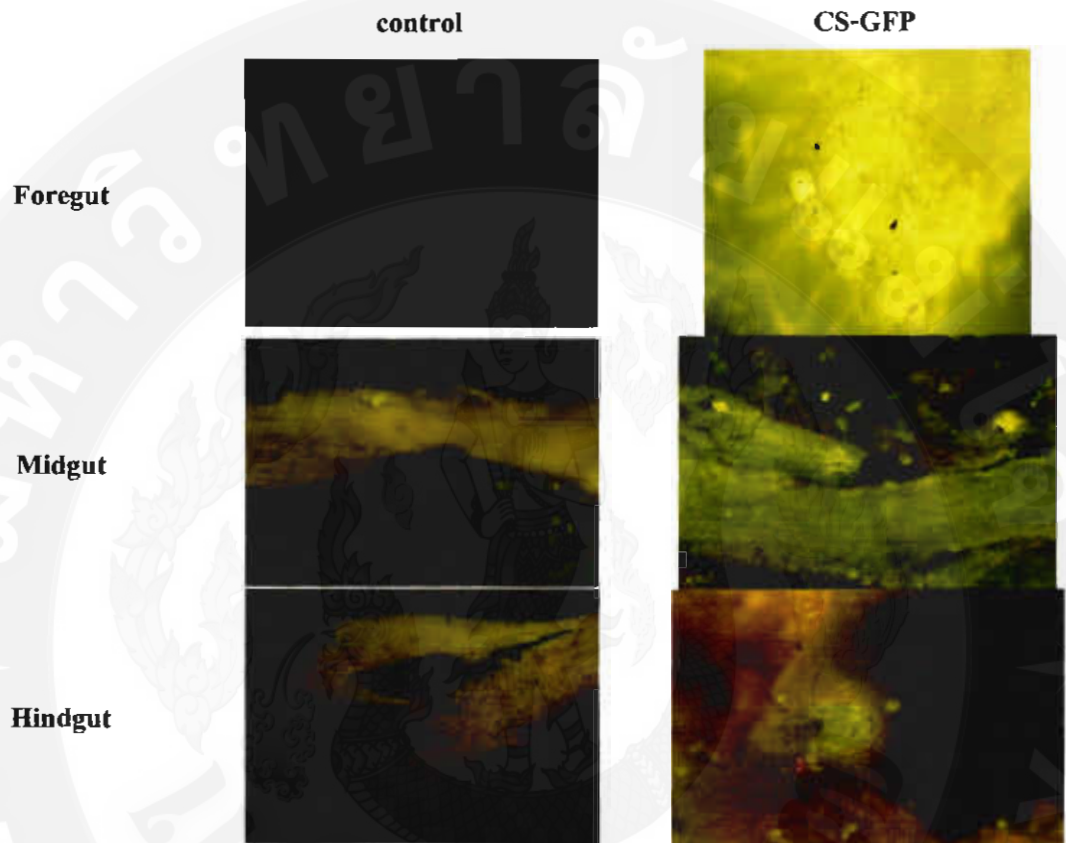


ภาพที่ 25 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งก้ำกรม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซาน  
บรรจุโปรตีน

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

Control : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

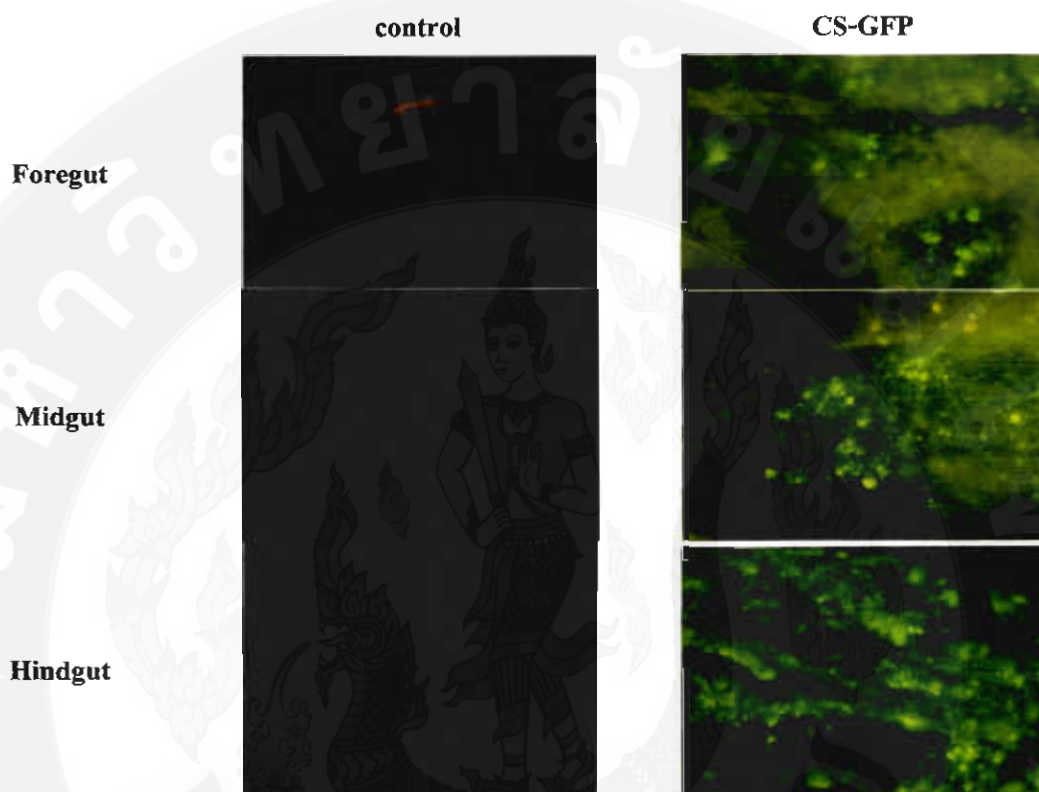


ภาพที่ 26 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งก้ำกรม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไลโคโตซาน  
บรรจุโปรตีน

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

Control : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไลโคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

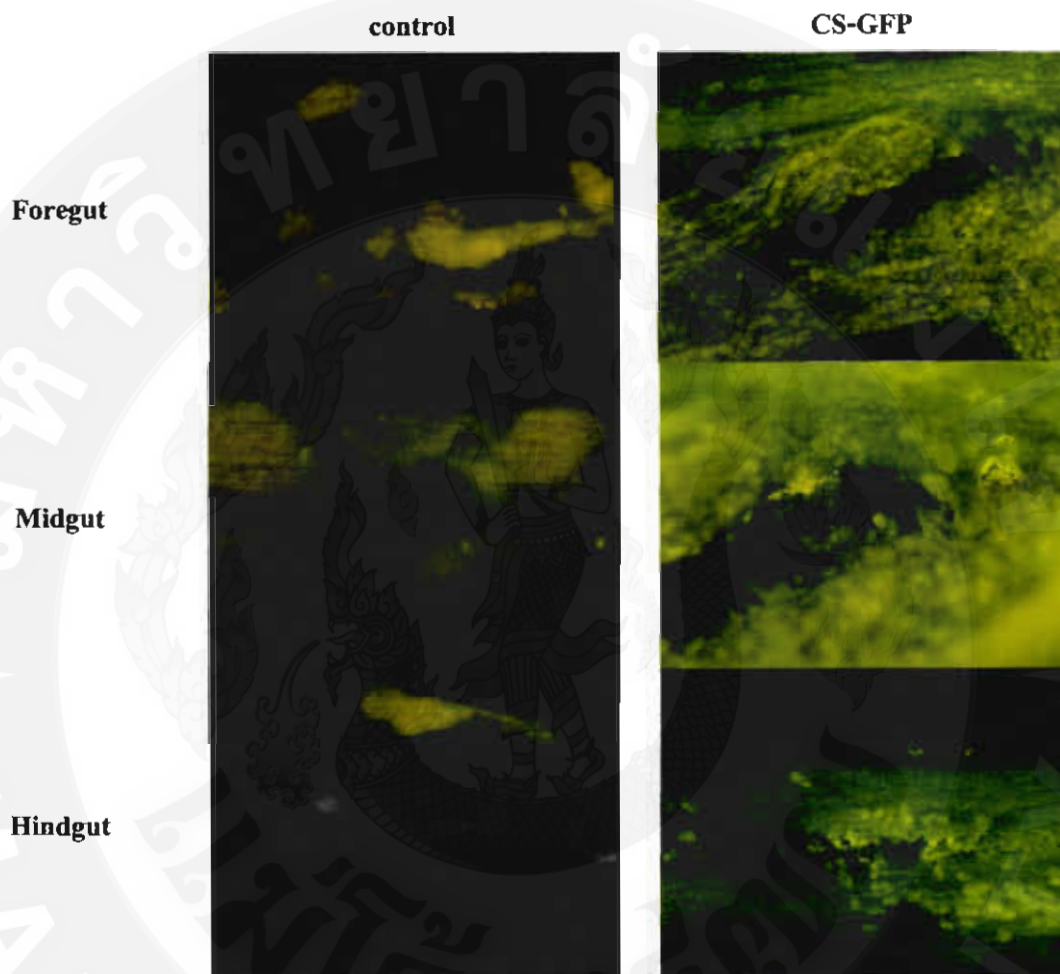


ภาพที่ 27 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้กึ่งก้ำกราม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโตซาน  
บรรจุโปรตีน

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

Control : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรามที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

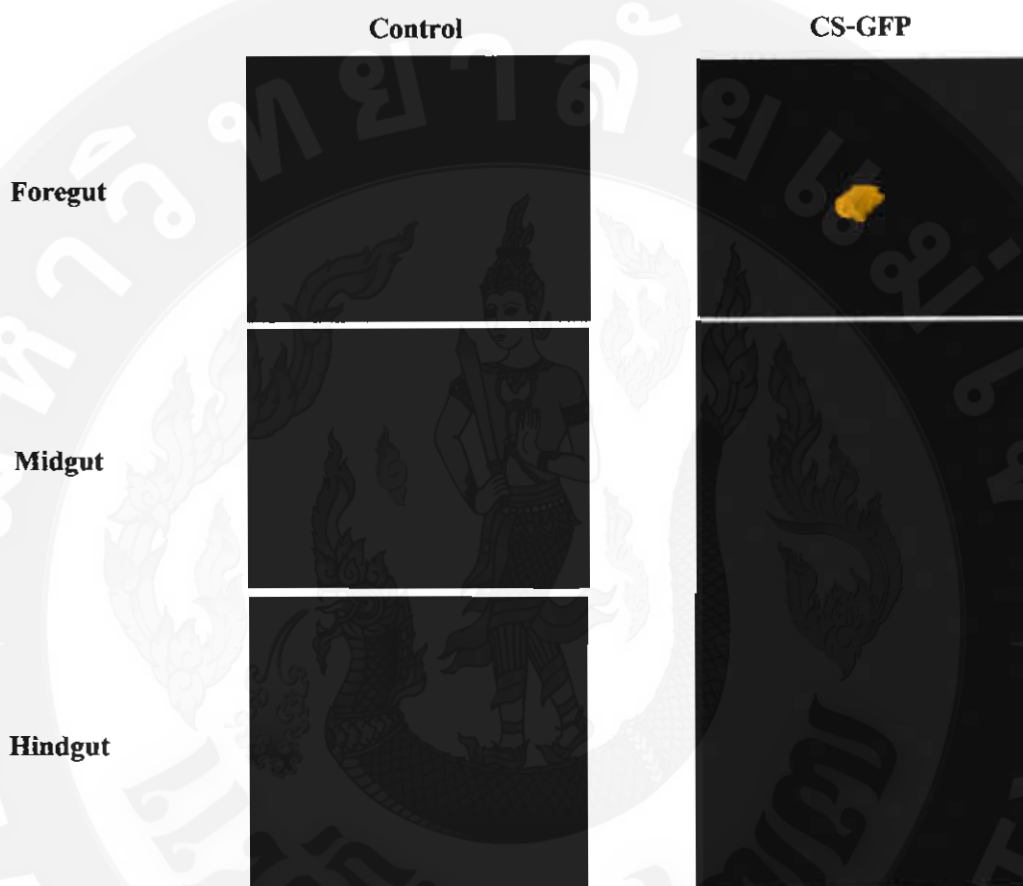


ภาพที่ 28 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ที่ลำไส้กึ่งก้ำกรม หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซาน  
บรรจุโปรตีน

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

Control : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : กึ่งก้ำกรมที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง



ภาพที่ 29 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ถ้าใส่ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุ

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

Control :ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP :ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

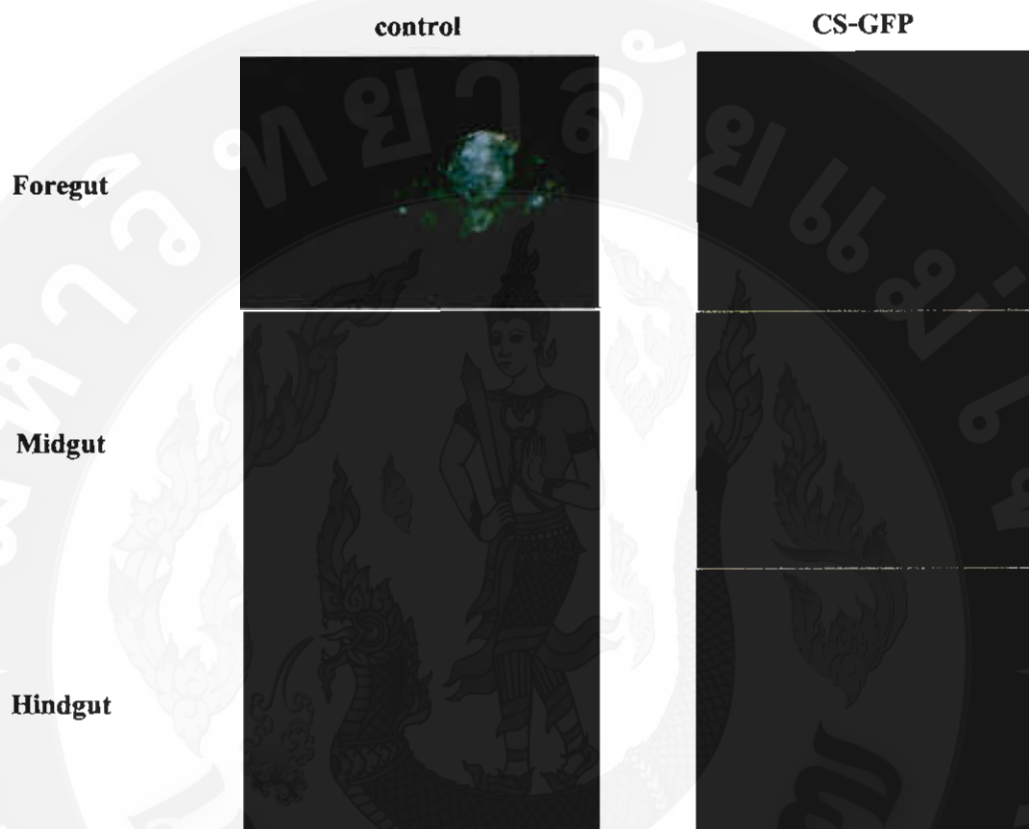


ภาพที่ 30 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ทำให้ปลานิลหลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุ

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

Control ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP :ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

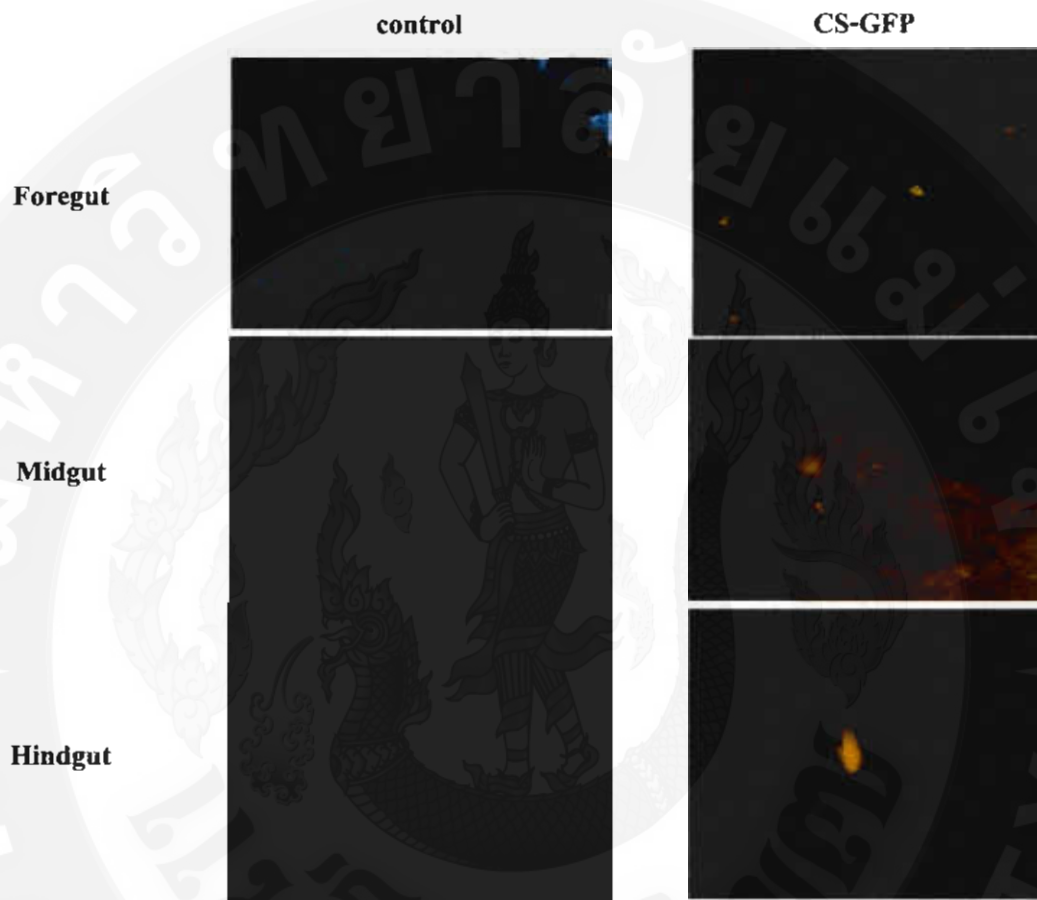


ภาพที่ 31 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ที่ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุ

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

Control : ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง



ภาพที่ 32 ภาพถ่ายฟลูออเรสเซนซ์ลำไส้ปลานิล หลังให้อาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุ

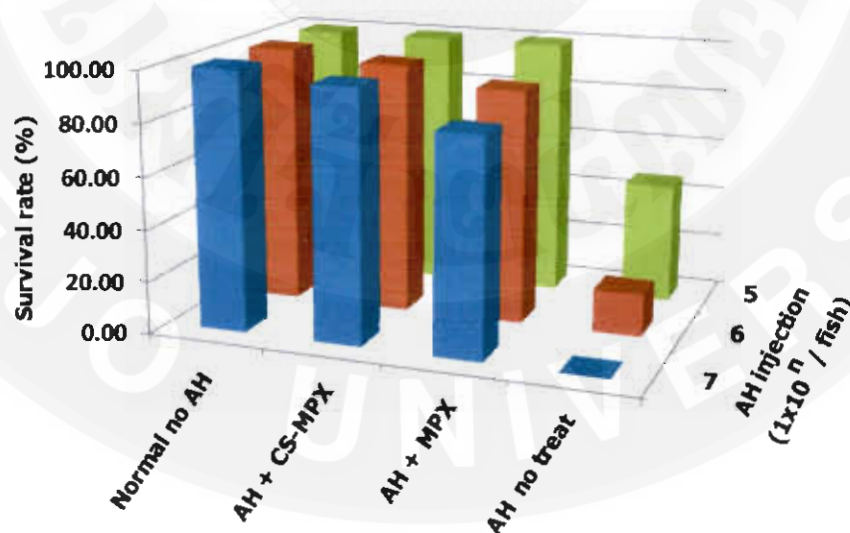
โปรตีนเรืองแสง (CS-GFP) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)

Control : ปลานิลที่ได้รับอาหารปกติ

CS-GFP : ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุโปรตีนเรืองแสง

#### 4. ประสิทธิภาพการนำส่งสารชีวภาพของอนุภาคนาโนไคโตซาน

ได้ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonashydrophila* ที่ปริมาณต่างๆ ให้ปลาชนิด ขนาด 150 กรัม และทดสอบการรักษาโดยให้อาหารผสมสารสกัดใบหูกวาง 0.1 % ในรูปสารสกัด ธรรมชาติและสารสกัดบรรจุในอนุภาคนาโนไคโตซาน โดยเปรียบเทียบกับปลานิลปกติและปลานิล ได้รับเชื้อแต่ไม่มีการให้สารสกัดใบหูกวาง ในการรักษา สังเกตอาการและนับจำนวนปลาที่รอดตาย เป็น เวลา 7 วัน พบว่า ปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อในปริมาณสูง ( $1 \times 10^7$  cfu/ตัว) และไม่ได้รักษา ปลาตายทั้งหมด ภายในเวลา 3 วัน ส่วนปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อในปริมาณกลาง ( $1 \times 10^6$  cfu/ตัว) และต่ำ ใน ( $1 \times 10^5$  cfu/ตัว) ปลาทยอยตายตลอด 7 วัน ส่วนปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อ และรักษาด้วยสารสกัดใบ หูกวาง มีอัตราการรอดตายมากกว่า 80% แต่สังเกตได้อย่างชัดเจนว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดใบ หูกวาง บรรจุในอนุภาคนาโนไคโตซานมีอัตราการรอดมากกว่า 95% ในปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณสูง และกลาง และมีอัตราการรอด 100% ในปลากลุ่มที่ได้รับเชื้อปริมาณต่ำ ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าอนุภาค นาโนไคโตซานช่วยในการนำส่งสารสกัดสมุนไพร ให้เข้าสู่ร่างกายของปลานิลได้ดี



ภาพที่ 33 ประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไคโตซานบรรจุสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อ *Aeromonas Hydrophila* ในปลานิล

## สรุปผลการวิจัย

### 1. การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซาน

การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานโดยใช้ TPP เป็น crosslinker วิธีที่เหมาะสม คือ วิธีโอโนโทริคเจเลนซึ่งเป็นวิธีที่ให้โครงสร้างของอนุภาคนาโนเป็นทรงกลม มีขบวนการง่าย ไม่สลับซับซ้อน ไม่ต้องใช้สารกำจัดน้ำมัน และไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนซึ่งจะต้องให้ปลาและกุ้งกินต่อไป

ดังนั้นในการสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานของงานวิจัยนี้ จะใช้โคโคซาน 81.45 %DD ที่ขนาด 140kDa ที่การกวน 900 -1,300 rpm จะได้อนุภาคนาโนโคโคซานขนาดเล็กที่สุด ระหว่าง 262.4–304.9 nm และสามารถสรุปคุณสมบัติของอนุภาคนาโนโคโคซานแปล่าที่ได้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คุณสมบัติของอนุภาคนาโนโคโคซาน

%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. การสร้างอนุภาคนาโนโคโคซาน-สารชีวภาพ

ในการสร้างอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารชีวภาพ โดยใช้โคโคซาน 81.45 %DD 140 k สำหรับอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดใบหูกวาง (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. การปลดปล่อยสารชีวภาพจากอนุภาคนาโนโคโคซาน

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

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

## 4. การนำส่งสารชีวภาพของอนุภาคนาโนโคโคซาน

อนุภาคนาโนโคโคซานสามารถช่วยให้การนำสารชีวภาพเข้าสู่ร่างกายของปลานิลได้ดี โดยช่วยให้ปลานิลติดเชื้อ *Aeromonashydrophila* และได้รับอาหารผสมอนุภาคนาโนโคโคซานบรรจุสารสกัดใบหูกวาง มีอัตราการรอดสูงกว่า ปลานิลติดเชื้อและได้รับอาหารผสมสารสกัดใบหูกวาง