

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุดิบและอุปกรณ์

วัสดุดิบที่ใช้ในการสกัดโคตินและโคโตนาน

- เกล็ดปลานิล (ประเทศไทย)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโคตินและโคโตนาน

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl, Merck, Germany)
- น้ำกลั่น

อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดโคตินและโคโตนาน

- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- แท่งแก้ว
- ขวดปรับปริมาตร
- กระจกบอควง
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)
- เครื่อง Magnetic stirrer
- เทอร์โมมิเตอร์
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette)
- ถาดสแตนเลส
- Silk Screen Cloth
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: Model 100-800, English)

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (EUTECH Instrument, Cyber scan pH 510, Singapore, 2002)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และเคมีของไคติน ไคโตซาน

- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- ขวดปรับปริมาตรขนาด 10, 100 และ 500 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu: Model UV-1800, Japan)
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette)
- กระจกบอดวง
- ซ้อนตักสาร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert: Model UNB400, USA)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของไคติน ไคโตซาน

- สารอะซีทิลกลูโคซามีน (Acetyl-glucosamine; GlcNAC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- สารดีกลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (D-glucosamine hydrochloride; GlcN Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- น้ำกลั่น
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl, Merck, Germany)

วัตถุดิบที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม

- ไคโตซานจากเกล็ดปลา
- กรดแลคติก (Lactic acid; $C_3H_6O_3$, Univar, Germany)
- กลีเซอริน
- เจลาติน
- น้ำ

- น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน (Lemongrass essential oil ; Suppaya, Thailand)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม

- Silk Screen Cloth
- เบ้าขึ้นรูป
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งตวงวัด 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)
- เครื่อง Magnetic stirrer
- เทอร์โมมิเตอร์
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette)
- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- แท่งแก้ว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของฟิล์ม

- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดความทนแรงดึง (Tensile strength) และการยืดตัว (% Elongation) (Instron, : Model 5565, U.S.A.)
- เครื่องวัดอัตราการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจนผ่านฟิล์ม (M & E Development center : Model VAC-V1, China)
- ไมโครมิเตอร์
- ขวดแก้ว
- ซ้อนตักสาร
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งตวงวัด 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และเคมีของฟิล์ม

- น้ำกลั่น

วัสดุที่ใช้ในการผลิตกระดาษ

- แป้งข้าวเหนียว
- แป้งถั่วเขียว
- กะทิ
- น้ำตาล
- กลิ่นใบเตย (Triple T, Thailand)
- น้ำ
- สีเขียวแอปเปิ้ล (Triple T, Thailand)
- น้ำมันมะพร้าว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตกระดาษ

- ถ้วยเหยือก
- กระทะทองเหลือง
- ไม้พาย
- ถาด
- ชุดเตาแก๊ส

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์ม

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)
- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- แอลกอฮอล์ร้อยละ 70
- เข็มเย็บเชื้อ
- ปิเปตแบบใช้ดวง (graduated pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette)

- กระบอกตวง
- จานเพาะเชื้อ (Plate)
- หลอดทดลอง (Tube)
- ที่วางหลอดทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์ม

- อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar; BD Becton Dickinson, France)
- น้ำกลั่น

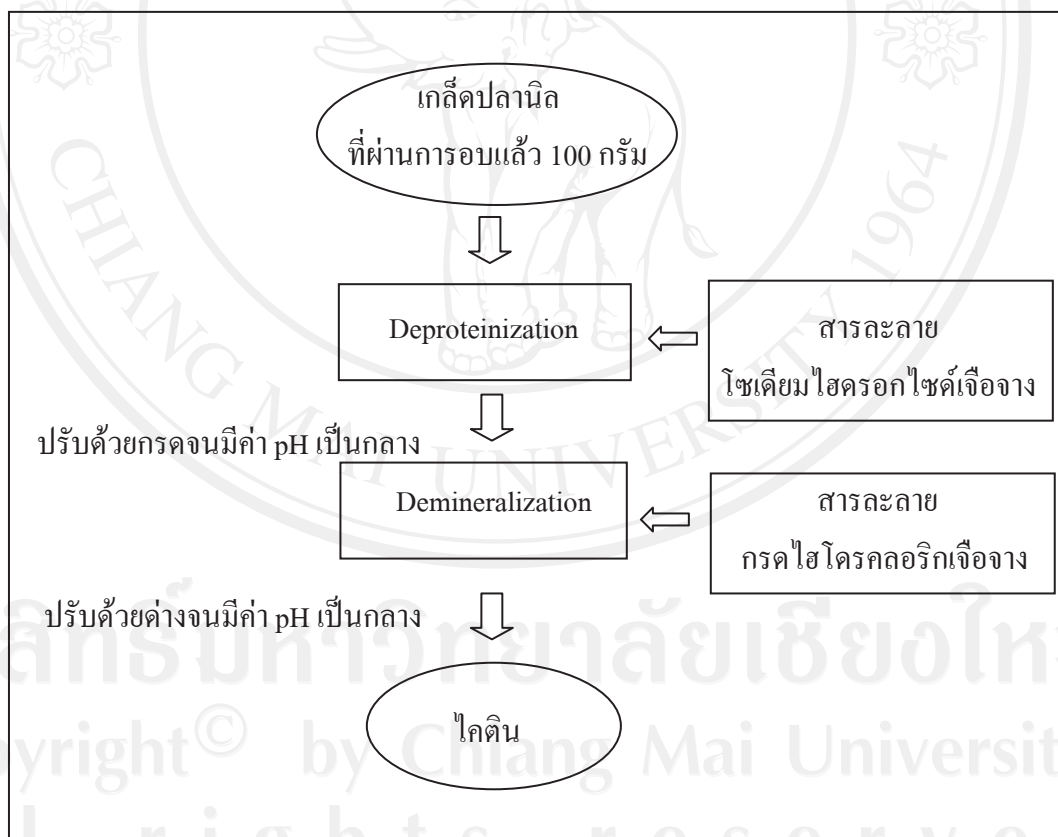
เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal computer)
- โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert version 7.1.6
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 13.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel version 2003

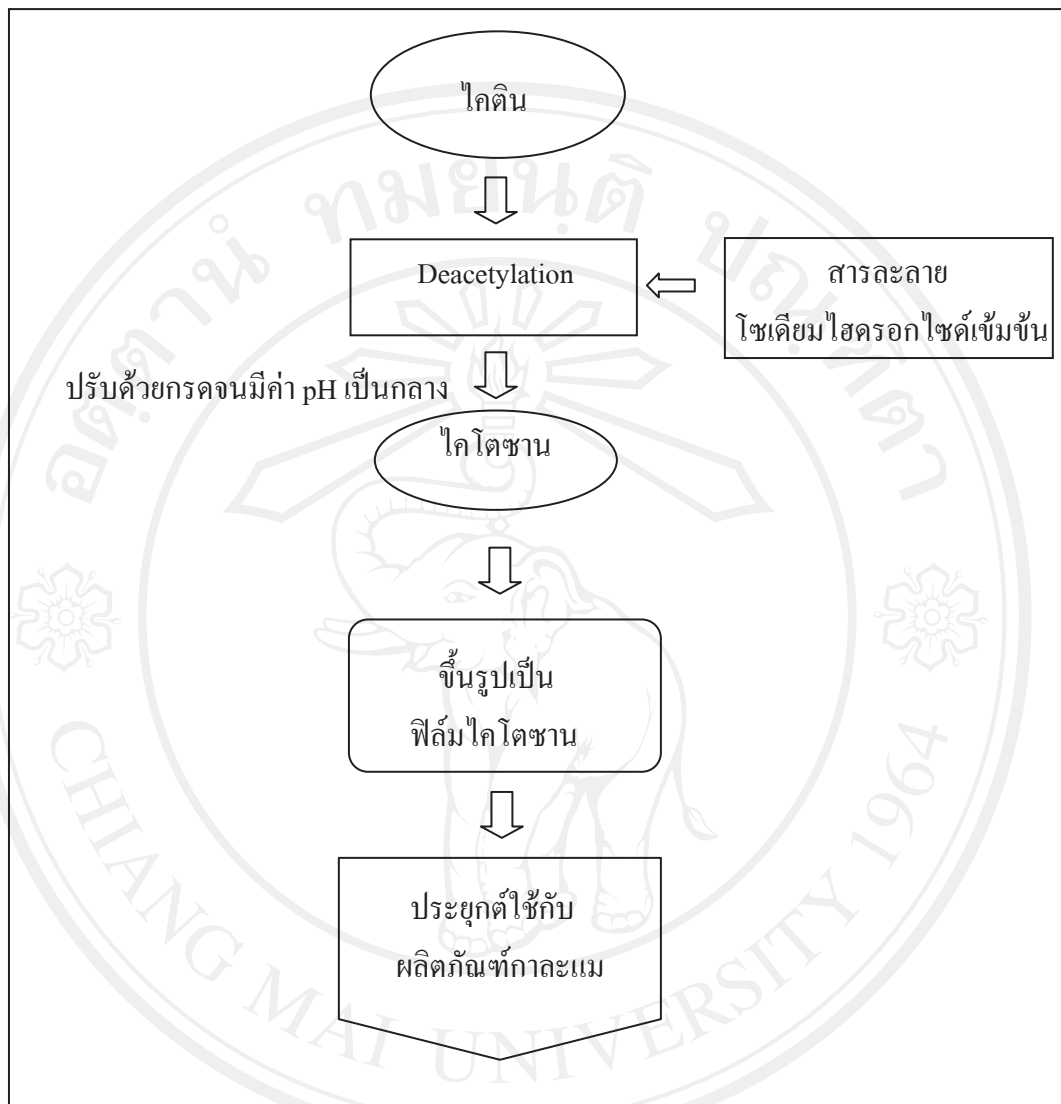
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

โคโตซานสกัดได้จากการนำเกล็ดปลานิลที่ผ่านอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงจำนวน 100 กรัม มาทำการกำจัดโปรตีนในสารละลายต่างอ่อน (Deproteinization) แล้วปรับด้วยกรดจนมีค่า pH เป็นกลาง ขึ้นตอนต่อมาทำการกำจัดแร่ธาตุ (Deminerlization) ในสารละลายกรดอ่อน โดยหลังจากนั้นปรับด้วยด่างจนมีค่า pH เป็นกลาง ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า โคติน นำโคตินที่ได้มาทำการกำจัดหมู่อะซีทิล (Deacetylation) ในสารละลายด่างเข้มข้นแล้วปรับด้วยกรดจนมีค่า pH เป็นกลาง ซึ่งจะทำให้ได้โคโตซาน และประยุกต์ใช้โคโตซานในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริโภคนได้ เพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์กาะแม โดยในขั้นตอนการสกัดและการทดลองในช่วงการสกัดแสดงได้ดังภาพที่ 3.1 และภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 แผนผังการสกัดโคตินจากเกล็ดปลานิลเพื่อใช้ในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริโภคนได้และการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์กาะแม



ภาพที่ 3.2 แผนผังการสกัดไคโตซานจากเกล็ดปลาเพื่อใช้ในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริเวณได้ และการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์กอลิเมอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนการทดลอง

ในการสกัดโคโคซานจากเกล็ดปลานิลเพื่อการผลิตแผ่นฟิล์มที่บริโภคได้ วางแผนการทดลองเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดโคโคซานที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ใช้ในกลุ่มผลิตอาหารจากเกล็ดปลานิล

การทดลองที่ 1.1 ขั้นตอนการกำจัดโปรตีน (Deproteination)

จากสมมติฐานที่ว่าในส่วนของเกล็ดปลานิลมีปริมาณของโปรตีนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะมีผลต่อการสกัดโคโคซาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดโปรตีนออกจากเกล็ดปลานิลโดยมีการวางแผนทดลองดังนี้

นำเกล็ดปลานิลที่ผ่านการล้าง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจำนวน 100 กรัม มาทำการกำจัดโปรตีนออก ทำการทดลองแบบ Central Composite Design ผันแปรตัวแปรในการสกัดดังนี้

1. ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในช่วงร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถึงร้อยละ 8 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 60 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส

ซึ่งระดับปัจจัยของการทดลอง และระดับปัจจัยของแต่ละสิ่งทดลองแสดงดังตารางที่

3.1

ตารางที่ 3.1 ระดับปัจจัยของการศึกษาผลความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และอุณหภูมิในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน

ปัจจัย	ระดับปัจจัย				
	-1.414 ($-\alpha$)	-1	0	+1	+1.414 ($+\alpha$)
ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์(น้ำหนักต่อปริมาตร)	0.76	2	5	8	9.24
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	55.86	60	70	80	84.14

กำหนดจุดที่ทำการศึกษา ตามแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design ในการศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ และอุณหภูมิในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน

สิ่งทดลอง	รหัสปัจจัย	ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์(น้ำหนักต่อปริมาตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
1	(1)	2.00	60.00
2	a	8.00	60.00
3	b	2.00	80.00
4	ab	8.00	80.00
5	$-\alpha a$	0.76	70.00
6	$+\alpha a$	9.24	70.00
7	$-\alpha b$	5.00	55.86
8	$+\alpha b$	5.00	84.14
9	Cp1	5.00	70.00
10	Cp2	5.00	70.00

ในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้อัตราส่วนของเกล็ดปลานิลต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าเท่ากับ 1 : 6 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วปรับส่วนผสมให้เป็นกลางด้วยกรด ทำการทดสอบด้วย pH meter ทำการซั่งเกล็ดปลานิลที่ได้แล้วหาร้อยละของการกำจัดโปรตีนออก

การทดลองที่ 1.2 ขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization)

จากสมมุติฐานที่ว่าในเกล็ดปลานิลมีปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะมีผลต่อการสกัดไคติน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุออกจากเกล็ดปลานิล โดยมีการวางแผนทดลองดังนี้

นำเกล็ดปลานิลที่ผ่านการกำจัดโปรตีนออก (การทดลองที่ 1.1) อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงจำนวน 30 กรัม มาทำการกำจัดแร่ธาตุออก โดยทำการทดลอง แบบ Central Composite Design ผันแปรตัวแปรในการสกัดดังนี้

1. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มล ในช่วงร้อยละ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และ 60 (ปริมาตรต่อปริมาตร)
2. เวลาที่ใช้ในการสกัด 6 ชั่วโมง และ 15 ชั่วโมง

ซึ่งระดับปัจจัยของการทดลอง และระดับปัจจัยของแต่ละสิ่งทดลองแสดงดัง ตารางที่

3.3

ตารางที่ 3.3 ระดับปัจจัยของการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มัด และเวลาในขั้นตอนกำจัดแร่ธาตุ

ปัจจัย	ระดับปัจจัย				
	-1.414 ($-\alpha$)	-1	0	+1	+1.414 ($+\alpha$)
ค่าร้อยละของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มัด (ปริมาตรต่อปริมาตร)	23.79	30	45	60	66.21
เวลา (ชั่วโมง)	4.14	6	10	15	16.86

กำหนดจุดที่ทำการศึกษา ตามแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 2 นอ้มัด และเวลาในขั้นตอนกำจัดแร่ธาตุ

สิ่งทดลอง	รหัสปัจจัย	ร้อยละความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 2 นอ้มัด (ปริมาตรต่อปริมาตร)	เวลา (ชั่วโมง)
1	(1)	30.00	6.00
2	a	60.00	6.00
3	b	30.00	15.00
4	ab	60.00	15.00
5	$-\alpha a$	23.79	10.50
6	$+\alpha a$	66.21	10.50
7	$-\alpha b$	45.00	4.14
8	$+\alpha b$	45.00	16.86
9	Cp1	45.00	10.50
10	Cp2	45.00	10.50

โดยในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้อัตราส่วนของเกล็ดปลานิลต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มล มีค่าเท่ากับ 1 : 6 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที แล้วปรับส่วนผสมให้เป็นกลางด้วยด่างทำการทดสอบด้วย pH meter ทำการชั่งเกล็ดปลาที่ได้หลังจากการกำจัดแร่ธาตุ แล้วหาค่าร้อยละของการกำจัดแร่ธาตุออก

การทดลองที่ 1.3 การผลิตโคโคซาน

นำโคโคตินจำนวน 20 กรัมที่ได้จากเกล็ดปลานิลที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การกำจัดโปรตีน (การทดลองที่ 1.1) และการกำจัดแร่ธาตุ (การทดลองที่ 1.2) แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซีทิลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design มีตัวแปรในการสกัดดังนี้

1. ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในช่วงร้อยละ 45 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ถึงร้อยละ 60 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2. อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 80 องศาเซลเซียส ถึง 120 องศาเซลเซียส

ซึ่งระดับปัจจัยของการทดลองและระดับปัจจัยของแต่ละสิ่งทดลองแสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ระดับปัจจัยของการศึกษาผลความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และอุณหภูมิในขั้นตอนการผลิตโคโคซาน

ปัจจัย	ระดับปัจจัย				
	-1.414 ($-\alpha$)	-1	0	+1	+1.414 ($+\alpha$)
ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)	41.89	45	52.50	60	63.11
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	71.72	80	100	120	128.28

กำหนดจุดที่ทำการศึกษา ตามแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองแบบ Central Composite Design ในการศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์และอุณหภูมิในขั้นตอนการผลิตไคโตซาน

สิ่งทดลอง	รหัสปัจจัย	ร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์(น้ำหนักต่อปริมาตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
1	(1)	45.00	80.00
2	a	60.00	80.00
3	b	45.00	120.00
4	ab	60.00	120.00
5	- α a	41.89	100.00
6	+ α a	63.11	100.00
7	- α b	52.50	71.76
8	+ α b	52.50	128.28
9	Cp1	52.50	100.00
10	Cp2	52.50	100.00

โดยในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้อัตราส่วนของเกลือปทานิตต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีค่าเท่ากับ 1 : 6 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปรับส่วนผสมให้เป็นกลางด้วยกรด ทำการทดสอบด้วย pH มิเตอร์ ทำการตรวจสอบค่าร้อยละการกำจัดหมู่อะซีทิลของไคโตซานที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer และคำนวณหาปริมาณไคโตซานที่สกัดได้ (Tao and Svetlana, 2008)

ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการผลิตฟิล์มไคโตซานและคุณสมบัติของฟิล์มไคโตซาน

2.1 การเตรียมฟิล์มที่บริเวณใต้จากไคโตซาน

วางแผนการทดลองแบบ Mixture design ผันแปรปัจจัย 3 ปัจจัยดังนี้

- สารละลายไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดแลคติกร้อยละ 1 ปริมาณที่ใช้ร้อยละ 40 ถึงร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
- กลีเซอริน ปริมาณที่ใช้ร้อยละ 1 ถึงร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

- สารป้องกันการเจริญของเชื้อจากธรรมชาติ โดยใช้ในปริมาณร้อยละ 0 ถึง ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ส่วนผสมที่คงที่ได้แก่

- เจลาติน ปริมาณที่ใช้ร้อยละ 15 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
- น้ำกลั่น ปริมาณที่ใช้ร้อยละ 35 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ได้ทำการกำหนดจุดที่ทำการศึกษา ตามแผนการทดลองแบบ Mixture design ดังตาราง

ที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แผนการทดลองแบบ Mixture design ในการศึกษาผลของสารละลายไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดแลคติกร้อยละ 1 ความเข้มข้นของกลีเซอริน และความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ในขั้นตอนการผลิตฟิล์มไคโตซาน

สิ่ง ทดลอง	น้ำหนักสารละลายไคโต ซาน (กรัม)*	น้ำหนัก กลีเซอริน (กรัม)	น้ำหนัก น้ำมัน ตะไคร้ (กรัม)	น้ำหนัก เจลาติน (กรัม)	น้ำหนัก น้ำกลั่น (กรัม)
1	44	1	5	15	35
2	42	3	5	15	35
3	49	1	0	15	35
4	42.5	5	2.5	15	35
5	40	5	5	15	35
6	45	5	0	15	35
7	46.5	1	2.5	15	35
8	47	3	0	15	35
9	44.5	3	2.5	15	35
10	45.75	3	1.25	15	35
11	49	1	0	15	35
12	45	5	0	15	35

หมายเหตุ * ไคโตซานร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรดแลคติกร้อยละ 1

นำสารละลายไปให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำแต่ละสิ่งทดลองที่ได้ไปกรองผ่าน Silk Screen Cloth เพื่อแยกเอาสิ่งแปลกปลอมที่หลงเหลือออก จึงนำสารละลายฟิล์มไคโตซานที่ได้ไปเทลงในเบ้าให้ฟิล์มมีความหนา 0.06 มิลลิเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเบ้าออกจากตู้อบแล้วลอกแผ่นฟิล์มไคโตซานออกมาจากเบ้า นำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

1. ความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มไคโตซานโดยใช้ Instron universal testing machine (ASTM, 2002)
2. คุณสมบัติการซึมผ่านของไอน้ำ (Jo *et al.*, 2004)
3. คุณสมบัติการซึมผ่านของก๊าซด้วยเครื่องวัดออกซิเจน (Qiu and Wen , 2008)

ทำการ Optimization เพื่อให้ได้สูตรในการผลิตฟิล์มที่บริโภคได้จากไคโตซาน

2.2 ทดสอบคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญของเชื้อรา (สิริรัตน์ และคณะ, 2548)

2.2.1 การเตรียมเชื้อ *Penicillium* เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยนำเชื้อจาก stock culture มาเลี้ยงบน Slant ของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วเขี่ยเชื้อใส่ลงในสารละลาย Dioctyl Sulfosuccinate ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจาง (Serial Dilution) ด้วยสารละลาย Peptone เพื่อให้ได้เชื้อปริมาณ 10^{-3} CFU/ml

2.2.2 คูดสารละลายเชื้อ (จากข้อ 6.1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในงานเลี้ยงเชื้อของ PDA โดยวิธี pour plate

2.2.3 นำแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของไคโตซานแตกต่างกันในแต่ละสูตร คัดให้มีขนาด 2.5x2.5 เซนติเมตร วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2 นำงานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน โดยระหว่างที่บ่มเชื้อให้สังเกตการเจริญของเชื้อรา *Penicillium*

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของฟิล์มไคโตซานที่มีต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์และราในผลิตภัณฑ์กอลาแม

เตรียมกอลาแม ขนาด กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร หนา 1 เซนติเมตร นำมาห่อด้วยฟิล์มไคโตซาน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์ และรา ทุก 3 วัน (AOAC, 1999)