

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

วัตถุดิบ

1. แป้งมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance: Sartorius BP 610, Germany)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance: Sartorius CP 224S, Germany)
3. เตาให้ความร้อน (Hot plate: Kika, Maraysia; Gerhardt, Germany)
4. เครื่องใล่อากาศโดยระบบอัลตราโซนิกส์ (Ultrasonic cleaner: Bransonic, U.S.A)
5. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
6. ตู้รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)
7. เครื่องวัดอุณหภูมิพร้อมโพรบในตัว (Thermometer: HI 98509-1, Hanna)
8. เครื่องวัดความหนาของแผ่นฟิล์ม (Vernier calipers: Mitutoyo, Japan)
9. เครื่องวัดความต้านทานแรงดึงขาดและความสามารถในการยืดตัว (Texture analyzer: TA.XT plus model, Switzerland)
10. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water activity: Aqualab 3TE, U.S.A)
11. เครื่องวิเคราะห์อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน (Oxygen permeation analyzer)
12. หม้อนึ่งความดันไฟฟ้าระบบอัตโนมัติ (Autoclave: Harayama, Japan)
13. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow: Holten Laminar HB 2472, Denmark)
14. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator: Heraeus B12, Germany)

อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ (Beaker)
2. กระบอกตวง (Cylinder)
3. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
4. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
5. ช้อนตักสารเคมี (Dispensing spoons)
6. ช้อนตักสารสเตนเลส (Stainless spatula)
7. แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสารละลาย (Magnetic stirrer bar)
8. โถดูดความชื้น (Desiccators)
9. ขวดน้ำกลั่น (Wash bottle)
10. กระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (Moisture can)
11. ที่คีบ (Crucible tong)
12. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
13. ถาดอะลูมิเนียม (Aluminum tray)
14. นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)
15. ฐานตั้งเหล็ก (Stand and base)
16. ที่จับอุปกรณ์การทดลอง (Boss head)
17. ที่จับคอนเดนเซอร์ (Condenser clamp)
18. จานเพาะเชื้อ (Plate)
19. เข็มเย็บเชื้อ (Needle and loop)
20. ไมโครปิเปต (Micropipette)
21. ขวด Duran
22. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

สารเคมี

1. กลีเซอรอล (Glycerol: MSDS, Cas No. 56-81-5)
2. โพแทสเซียมซอร์เบท (Potassium sorbate: Sigma-aldrich, Cas No. 24634-

3. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride: MSDS, Cas No. 10043-52-4)
4. เอทานอล (Ethanol: Merck, Cas No. 1.00983)
5. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ 100% ตราเพียวริตี้ (บริษัท เพียวเมานีเทน จำกัด)

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* (ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, TISTR No. 3254)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (Difco, Cas No.213400)

วิธีการทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของกลีเซอรอล (glycerol) และ โพแทสเซียมซอร์เบท (potassium sorbate) ที่มีต่อสมบัติของฟิล์มจากแป้งมันสำปะหลัง

ในการเตรียมฟิล์มจะควบคุมปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ร้อยละ 5 ให้ความร้อนที่ระดับ 1.6 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Flores et al., 2007) ไล่ฟองอากาศโดยคลื่นอัลตราโซนิกส์ความถี่ 47 kHz (ultrasonic, Branson 2210, U.S.A) เป็นเวลา 10 นาที (ปนัดดา, 2540) ซ้อนฟองทิ้ง เทส่วนผสมลงบน glass plate ปริมาณ 30 กรัม จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม โดยนำส่วนผสมไปผ่านการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในตู้อบลมร้อนและไม่ให้รังสี UVc

ชุดที่ 2 ชุดทดลอง โดยนำส่วนผสมไปผ่านรังสี UVc ในเวลาที่เหมาะสม จากนั้นนำไปผ่านการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในตู้อบลมร้อน

สำหรับปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของฟิล์มจากแป้งมันสำปะหลัง ได้แก่

1. ปริมาณกลีเซอรอล (ร้อยละ 0 - 3) (ดัดแปลงจาก ปนัดดา, 2540)
2. ปริมาณโพแทสเซียมซอร์เบท (0 - 2,000 ppm) (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

ฉบับที่ 84)

ตัวอย่างฟิล์มที่ได้จะนำไปวัดความแข็งแรง ได้แก่ การต้านแรงดึงขาด (tensile strength) และการยืดตัว (elongation) ด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (texture analyzer, TA-XT Plus, UK) รวมถึงปริมาณความชื้น (AOAC, 2005) และปริมาณน้ำอิสระ (a_w , Aqualab 3TE, U.S.A) อาศัยการวางแผนแบบ Rotatable central composite design (2^2 Factorial) ทำให้ได้จำนวนทริตเมนต์ทั้งสิ้น 13 ทริตเมนต์ (ตาราง 6) มีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และหาความสัมพันธ์ของตัวแปร ตลอดจนคาดคะเนลักษณะของฟิล์มที่เหมาะสมตามปัจจัยที่มีอิทธิพล โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab V.15

ตาราง 6 การวางแผนการทดลองแบบ Rotatable central composite design (2 ปัจจัย)

ทริตเมนต์	ใส่รหัส		ถอดรหัส	
	ปริมาณ potassium sorbate (ppm.)	ปริมาณ glycerol (%)	ปริมาณ potassium sorbate (ppm.)	ปริมาณ glycerol (%)
1	-1.41	0	0.00	1.50
2	+1	+1	1707.11	2.56
3	-1	-1	292.89	0.44
4	0	0	1000.00	1.50
5	0	-1.41	1000.00	0.00
6	0	0	1000.00	1.50
7	-1	+1	292.89	2.56
8	0	0	1000.00	1.50
9	0	0	1000.00	1.50
10	0	+1.41	1000.00	3.00
11	+1	-1	1707.11	0.44
12	0	0	1000.00	1.50
13	+1.41	0	2000.00	1.50

การศึกษาอิทธิพลของรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีต่อฟิล์มจากแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง โดยผสมแป้งมันสำปะหลัง กลีเซอรอล โปแตสเซียมซอร์เบต และน้ำกลั่น (distilled water) ในอัตราส่วน 5.0 : 2.5 : 0.2 : 92.3 โดยน้ำหนัก (Flores et al., 2007) ให้ความร้อนที่ระดับ 1.6 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Flores et al., 2007) ไล่ฟองอากาศโดยคลื่นอัลตราโซนิกส์ 47 kHz (ultrasonic, Bransonic 2210, U.S.A) เป็นเวลา 10 นาที (ปนัดดา, 2540) ซ้อนฟองทิ้ง แล้วเทส่วนผสมลงบน glass plate ปริมาณ 30 กรัม จากนั้นทำให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และดำเนินการศึกษาดังทริตเมนต์ต่อไปนี้ (ภาพ 15)

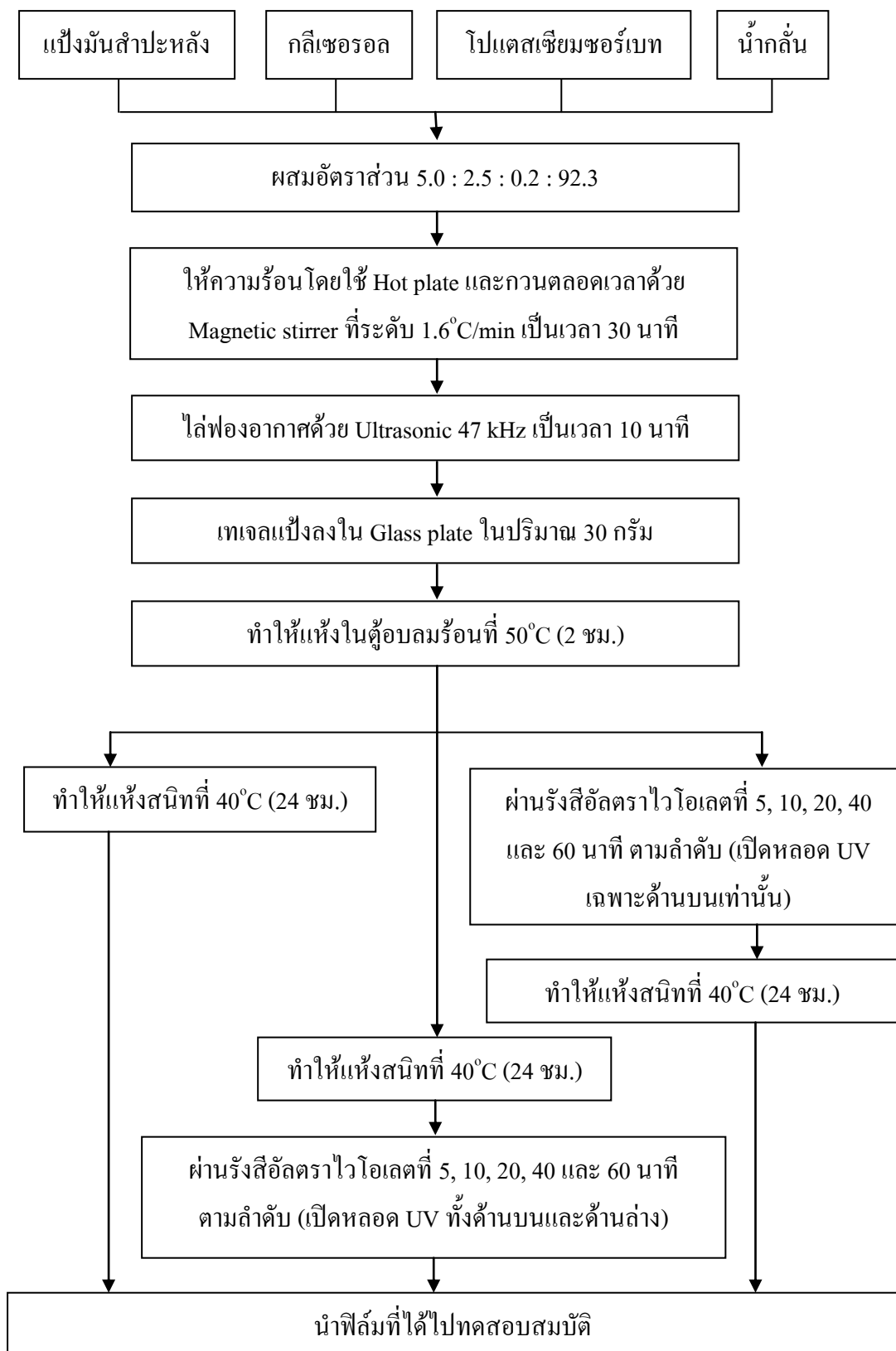
ชุดควบคุมที่ไม่ให้รังสี UVc (A) ทำส่วนผสมให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาในภาชนะปิดสนิทที่มีแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2 ; RH ร้อยละ 0) เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปทดสอบลักษณะพื้นฐานของแผ่นฟิล์ม

ชุดที่ผ่านการลดความชื้นก่อนการผ่านรังสี UVc (B) ลดความชื้นในฟิล์มโดยอาศัยวิธีการเดียวกับชุดควบคุมคือการอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้ลอกฟิล์มออกจาก glass plate แล้วนำไปผ่านรังสี UVc เป็นเวลา 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ เก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดสนิทที่มี CaCl_2 (RH ร้อยละ 0) เป็นเวลา 3 วัน นำไปทดสอบลักษณะพื้นฐานของแผ่นฟิล์ม

ชุดที่ผ่านการลดความชื้นหลังการผ่านรังสี UVc (C) นำฟิล์มที่ได้ผ่านรังสี UVc เป็นเวลา 5, 10, 20, 40 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาในภาชนะปิดสนิทที่มี CaCl_2 (RH ร้อยละ 0) เป็นเวลา 3 วัน นำไปทดสอบลักษณะพื้นฐานของแผ่นฟิล์ม

ลักษณะพื้นฐานของแผ่นฟิล์มแป้งมันสำปะหลังที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณความชื้น โดยกำหนดขนาดแผ่นฟิล์มที่ 2x2 เซนติเมตร ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ความสามารถในการต้านแรงดึงขาดและความสามารถในการยืดตัวโดย Standard Method (ASTM Standard Philadelphia, 1991) และอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนตามวิธี ASTM D 1434-82 (Reapproved 1992)

อาศัยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design: CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพ 15 แผนผังการเตรียมฟิล์มจากน้ำมันสำปะหลัง

ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Aspergillus niger* ของฟิล์มจากแป้งมันสำปะหลัง

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Aspergillus niger* โดยนำ น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดบรรจุเชื้อ ดึงส่วน suspension ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ อยู่ที่ 1×10^{10} CFU/ml และทำ dilution ให้มีปริมาณจุลินทรีย์ 1×10^3 CFU/ml ทั้งนี้ในการทดสอบ จะดึง suspension ดังกล่าวมาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread plate ลงบนอาหาร Potato dextrose agar (ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พื้นที่ 255 ตารางเซนติเมตร) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง โดยวิธี disc diffusion assay (Kumar et al., 2001; Gulluce et al., 2004) เกลี่ย suspension ให้ทั่ว ทั้งไว้ประมาณ 15 นาที จากนั้นวางแผ่นฟิล์มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้น ซึ่งฟิล์มที่ใช้ในการทดสอบ มีอยู่ 4 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 (A) ฟิล์มที่ไม่ผ่านรังสี UVc และไม่มีโปแตสเซียมซอร์เบท

ชุดที่ 2 (B) ฟิล์มที่ไม่ผ่านรังสี UVc และมีโปแตสเซียมซอร์เบท

ชุดที่ 3 (C) ฟิล์มที่ผ่านรังสี UVc และไม่มีโปแตสเซียมซอร์เบท

ชุดที่ 4 (D) ฟิล์มที่ผ่านรังสี UVc และมีโปแตสเซียมซอร์เบท

จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโคโลนี ของจุลินทรีย์ และ clear zone