

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบและอุปกรณ์

วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดโคตินและโคโตนาน

- 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
- กระบอกตวง
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งตวงวัด 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
- ขวดปริมาตรขนาด 10, 100 และ 500 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu: Model UV-1800, Japan)
- ไมโครปิเปต (Micro Pipette)
- กระบอกตวง
- ช้อนตักสาร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert: Model UNB400, USA)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของไคติน ไคโตซาน

- สารอะซิติลกลูโคซามีน (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
- กรดแลกติก (Lactic acid; $C_3H_6O_3$, Univar, Germany)
- กลีเซอริน
- เจลาติน
- น้ำ

- น้ำมันหอมระเหยตะไคร้บ้าน (Lemongrass essential oil ; Suppaya, Thailand)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม

- Silk Screen Cloth
- เป้าขึ้นรูป
- 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
- ซ้อนดักสาร
- เครื่องชั่งตวงวัด 4 ตำแหน่ง (Vibra, AF-R220E, Japan)
- เครื่องชั่งตวงวัด 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo: Model PB153, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และเคมีของฟิล์ม

- น้ำกลั่น

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกาสะแม

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

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตกาสะแม

- ถ้วยเหยือก
- กระทะทองเหลือง
- ไม้พาย
- ถาด
- ชุคเตาแก๊ส

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
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- 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

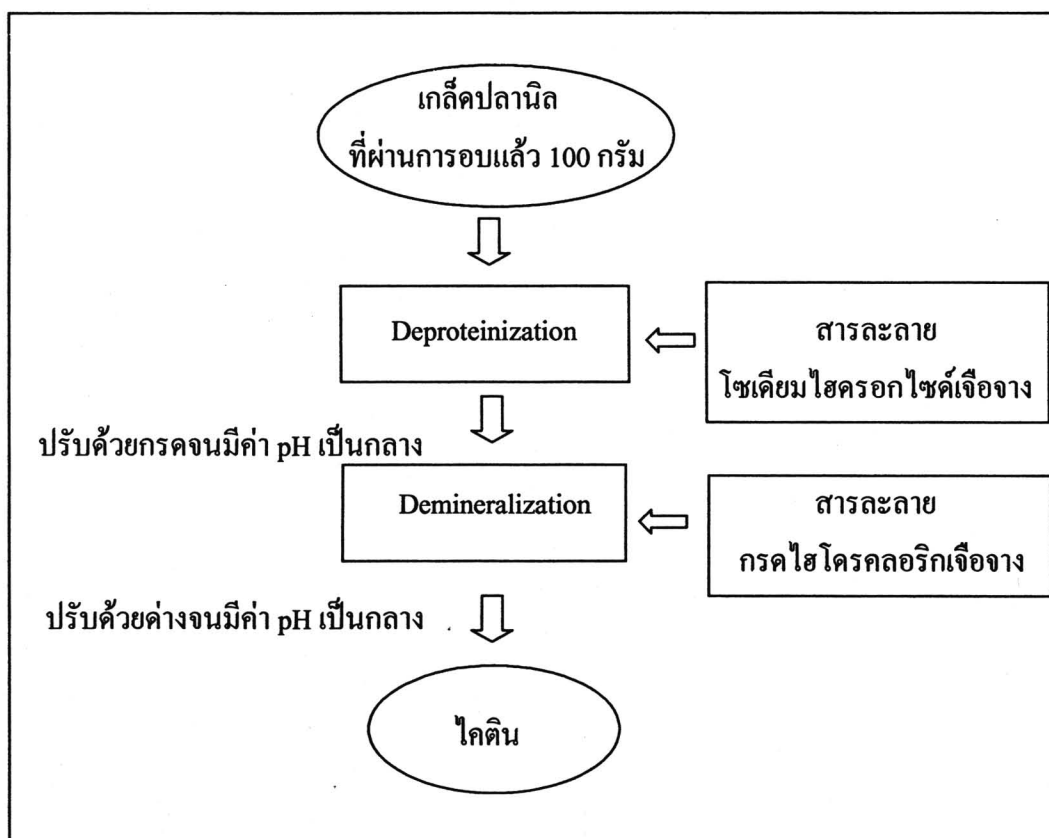
- อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar; BD Becton Dickinson, France)
- น้ำกลั่น

เครื่องประมวลผลทางสถิติ

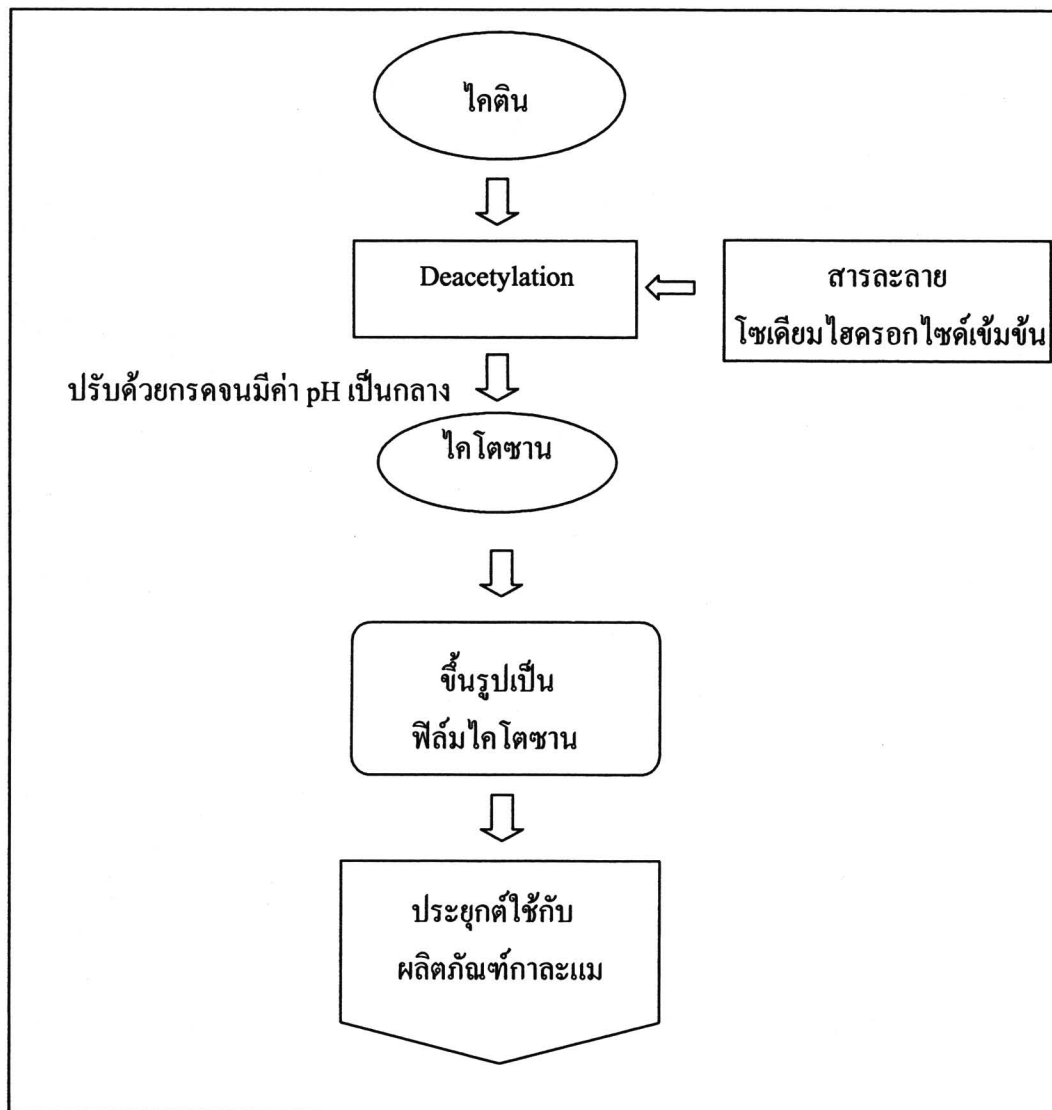
- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal computer)
- โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert version 7.1.6
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 13.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel version 2003

วิธีการทดลอง

โคโคซานสกัดได้จากการนำเกล็ดปลานิลที่ผ่านอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงจำนวน 100 กรัม มาทำการกำจัดโปรตีนในสารละลายด่างอ่อน (Deproteinization) แล้วปรับด้วยกรดจนมีค่า pH เป็นกลาง ขั้นตอนต่อมาทำการกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization) ในสารละลายกรดอ่อน โดยหลังจากนั้นปรับด้วยด่างจนมีค่า pH เป็นกลาง ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า โคคิน นำโคคินที่ได้มาทำการกำจัดหมู่อะซีทิล (Deacetylation) ในสารละลายด่างเข้มข้นแล้วปรับด้วยกรดจนมีค่า pH เป็นกลาง ซึ่งจะทำให้ได้โคโคซาน และประยุกต์ใช้โคโคซานในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริโภคได้ เพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์กอลาเม โดยในขั้นตอนการสกัดและการทดลองในช่วงการสกัดแสดงได้ดังภาพที่ 3.1 และภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 แผนผังการสกัดโคคินจากเกล็ดปลานิลเพื่อใช้ในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริโภคได้และการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์กอลาเม



ภาพที่ 3.2 แผนผังการสกัดไคโตซานจากเกล็ดปลานิลเพื่อใช้ในการขึ้นรูปเป็นฟิล์มที่บริโภคได้ และการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ก่าละแม



แผนการทดลอง

ในการสกัดโคโคซานจากเกล็ดปลานิลเพื่อการผลิตแผ่นฟิล์มที่บริโภคได้ วางแผนการทดลองเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาวิธีการสกัดโคโคซานที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ใช้ในกลุ่มผลิตอาหารจากเกล็ดปลานิล

การทดลองที่ 1.1 ขั้นตอนการกำจัดโปรตีน (Deproteinization)

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 (-α)	-1	0	+1	+1.414 (+α)
ร้อยละความเข้มข้นของ โซเดียมไฮดรอกไซด์(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 และอุณหภูมิในขั้นตอนการกำจัด โปรตีน

สิ่งทดลอง	รหัสปัจจัย	ร้อยละความเข้มข้นของ โซเดียมไฮดรอกไซด์(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	-αa	0.76	70.00
6	+αa	9.24	70.00
7	-αb	5.00	55.86
8	+αb	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 ทำการชั่งเกล็ดปลาที่ได้แล้วหาร้อยละของการกำจัดโปรตีนออก

การทดลองที่ 1. 2 ขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization)

จากสมมุติฐานที่ว่าในเกล็ดปลานิลมีปริมาณของแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบ ซึ่งจะมีผลต่อการสกัดไคติน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุออกจากเกล็ดปลานิล โดยมีการวางแผนทดลองดังนี้

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

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

ซึ่งระดับปัจจัยของการทดลอง และระดับปัจจัยของแต่ละสิ่งทดลองแสดงดัง ตารางที่

ตารางที่ 3.3 ระดับปัจจัยของการศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มัล และเวลาในขั้นตอนกำจัดแร่ธาตุ

ปัจจัย	ระดับปัจจัย				
	-1.414 (-α)	-1	0	+1	+1.414 (+α)
ค่าร้อยละของความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มัล (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 นอ้มัล และเวลาในขั้นตอนกำจัดแร่ธาตุ

สิ่งทดลอง	รหัสปัจจัย	ร้อยละความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 2 นอ้มัล (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	-αa	23.79	10.50
6	+αa	66.21	10.50
7	-αb	45.00	4.14
8	+αb	45.00	16.86
9	Cp1	45.00	10.50
10	Cp2	45.00	10.50

โดยในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้อัตราส่วนของเกล็ดปลานิลต่อกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอ้มัล มีค่าเท่ากับ 1 : 6 คนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กตลอดเวลาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที แล้วปรับ ส่วนผสมให้เป็นกลางด้วยด่างทำการทดสอบด้วย pH meter ทำการชั่งเกล็ดปลาที่ได้หลังจาก การกำจัดแร่ธาตุ แล้วหาค่าร้อยละของการกำจัดแร่ธาตุออก

การทดลองที่ 1.3 การผลิตไคโตซาน

นำไคตินจำนวน 20 กรัมที่ได้จากเกล็ดปลานิลที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การกำจัด โปรตีน (การทดลองที่ 1.1) และการกำจัดแร่ธาตุ (การทดลองที่ 1.2) แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มาทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซีทิลด้วยโซเดียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 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 และอุณหภูมิใน ขั้นตอนการผลิตไคโตซาน

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

กำหนดจุดที่ทำการศึกษา ตามแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ดัง ตารางที่ 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

โดยในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้อัตราส่วนของเกล็ดปลานิลต่อโซเดียมไฮดรอกไซด์ 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 การเตรียมฟิล์มที่บริโภคน้ำได้จากไคโตซาน

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) ในกรดแลกติกร้อยละ 1 ความเข้มข้นของกลีเซอริน และความเข้มข้นของ น้ำมันตะไคร้ในขั้นตอนการผลิตฟิล์มไคโตซาน

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) ในกรดแลกติกร้อยละ 1

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

1. ความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มไคโตซาน โดยใช้ 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 คุ้สารละลายเชื้อ (จากข้อ 6.1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อของ PDA โดยวิธี pour plate

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

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของฟิล์มไคโตซานที่มีต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์และราในผลิตภัณฑ์กาดะแม

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