บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพลาสมาโปรตีน

เก็บตัวอย่างเลือดสุกร จากกระบวนการเอาเลือดออก (bleeding line) ของโรงฆ่าสัตว์เทศบาล อ.เมือง จ.พิษณุโลก เติมโซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ทันที (ร้อยละ 0.6 น้ำหนัก/ปริมาตร) แยกสารละลายพลาสมาโปรตีนออกโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใส (พลาสมาโปรตีน) มาทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบฉีดพ่นฝอย (spray dried) เก็บส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวที่ได้ บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท นำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อให้มีความชื้นคงที่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ในตู้เย็น จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมฟิล์มพลาสมาโปรตีน

การเตรียมฟิล์มพลาสมาโปรตีนทำได้โดยละลายผงพลาสมาโปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำกลั่น เติมพลาสติไซเซอร์ (plasticizer)คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) และคนตลอดเวลา ทิ้งให้สารละลายอุ่นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปขึ้นรูปเป็นฟิล์มในเพลทพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60±5) สารละลายจะแข็งตัวภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ลอกฟิล์มที่แห้งออก และเก็บฟิล์มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์ต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของพลาสติไซเซอร์ 3 ชนิด คือ กลีเซอรอล, ซอร์บิทอล และพอลิเอทิลีนไกลคอล 400

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์ โดยใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แบ่งเป็นชุดการทดลองได้ 4 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ ร้อยละ 20, 30, 40, 50 และ 60 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน)

ชุดที่ 2 ใช้ความเข้มข้นของซอร์บิทอล ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ ร้อยละ 20, 30, 40, 50 และ 60 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน)

ชุดที่ 3 ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในชุดที่ 1) ร่วมกับซอร์บิทอลที่มีความ
เข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมซอร์บิทอล

ชุดที่ 4 ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในชุดที่ 1) ร่วมกับพอลิเอทิลีนไกลคอล 400 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมพอลิเอทิลีนไกลคอล 400

การปรับปรุงสมบัติของฟิล์ม

ทำการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโดยการเตรียมเป็นฟิล์มพลาสมาโปรตีน-พอลิแซคคาไรด์ และฟิล์มพลาสมาโปรตีน-ลิปิดอิมัลชัน โดยใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ร่วมกับพอลิเอทิลีนไกลคอล 400 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) เป็นพลาสติไซเซอร์

ผลของการเติมพอลิแซคคาไรด์ต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของพอลิแซคคาไรด์ 3 ชนิด คือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส, เพคติน และคาราจิแนน

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์ โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน แบ่งเป็นชุดการทดลองได้ 3 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 ใช้ความเข้มข้นของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

ชุดที่ 2 ใช้ความเข้มข้นของเพคตินที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมเพคติน

ชุดที่ 3 ใช้ความเข้มข้นของคาราจิแนนที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมคาราจิแนน

ผลของการเติมลิปิดต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีน

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของกรดไขมัน 2 ชนิด คือ กรดลอริก และทวีน 80

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของกรดไขมัน โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน แบ่งเป็นชุดการทดลองได้ 2 ชุด ดังต่อไปนี้

ชุดที่ 1 ใช้ความเข้มข้นของกรดลอริคที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมกรดลอริค

ชุดที่ 2 ใช้ความเข้มข้นของทวีน 80 ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 (น้ำหนัก/น้ำหนักพลาสมาโปรตีน) และชุดควบคุมเป็นชุดที่ไม่เติมทวีน 80

ป QP 99.3 .P7 พ271ก 2550

i.3999303 c.2 สำนักหอสมุด 21 พ.ย. 2550

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของฟิล์มพลาสมาโปรตีน

ความหนาของฟิล์ม (film thickness)

นำแผ่นฟิล์มมาวัดความหนาโดยใช้เครื่องวัดความหนา (caliper micrometer) วัดรอบ ๆ แผ่นฟิล์ม 6 ตำแหน่ง และทำการทดลอง 4 ซ้ำ

สมบัติทางกลของฟิล์ม (film mechanical properties) (Mariniello et al., 2003)

นำแผ่นฟิล์มมาตัดให้มีขนาด 20×75 มิลลิเมตร โดยมีระยะห่างของหัววัดเท่ากับ 30 มิลลิเมตร และความเร็วของหัววัดเท่ากับ 30 มิลลิเมตร/นาที โดยทำการวัดค่าการต้านทานแรงดึงขาดและค่าการยืดตัวของแผ่นฟิล์มโดยใช้เครื่อง Instron Universal Machine ยี่ห้อ INSTRON รุ่น 4411 ใช้หัวทดสอบแบบ tension ที่มีลักษณะเป็นหัวหนีบ 2 หัว ทำการทดลอง 6 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า tensile strength (TS) และ elongation-at-break (%E) ดังนี้

$$\text{ค่าการต้านทานแรงดึงขาด (กิโลกรัม/มิลลิเมตร}^2\text{)} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้ (กิโลฟอร์ส)}}{\text{ความกว้าง (มิลลิเมตร)} \times \text{ความยาว (มิลลิเมตร)}}$$

$$\text{ค่าการยืดตัว (ร้อยละ)} = \frac{\text{ระยะยืดตัวของแผ่นฟิล์ม (มิลลิเมตร)}}{\text{ความยาวเริ่มต้นของแผ่นฟิล์มระหว่างหัววัด (มิลลิเมตร)}} \times 100$$

ความโปร่งแสงของฟิล์ม (film transparency) (วารินทร์ พิมพา, 2547; Cho & Rhee, 2004)

นำแผ่นฟิล์มมาตัดให้มีขนาด 3×5 เซนติเมตร และนำมาวัดความโปร่งแสงหลังจากวัดค่าความหนาของฟิล์ม โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ PERKIN ELMER รุ่น LAMDA 20 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการทดลอง 4 ซ้ำนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความโปร่งแสง ดังนี้

$$\text{Transparency} = A_{600}/b$$

โดย A_{600} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

b = ความยาวทางเดินแสงผ่านสารตัวอย่าง (ความหนาของฟิล์ม)

การซึมผ่านไอน้ำ (water vapor permeability) (วิชชรา บัวชุม, 2545)

นำแผ่นฟิล์มที่ลอกได้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร โดยตัวอย่างต้องปราศจากรอบพับ ขีด รูรั่วที่มองเห็นได้ นำไปปิดปากถ้วยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.8 เซนติเมตร และสูง 5.8 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วยน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด และนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และทำการทดลอง 4 ซ้ำ ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการซึมผ่านของไอน้ำดังนี้

อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate; WVTR)

$$WVTR = \frac{(G/t)}{A}$$

โดย WVTR = อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (กรัม/เมตร^2.ชั่วโมง)

G/t = อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่อเวลา

A = พื้นที่ตัวอย่าง (เมตร^2)

การซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability; WVP อ่านค่าที่ได้เป็นหน่วย กรัม.มิลลิเมตร/เมตร^2.ชั่วโมง.กิโลปาสคาล)

$$WVP = \text{permeance} \times \text{thickness}$$

$$\text{Permeance} = \frac{WVTR}{\Delta P} = \frac{WVTR}{S(R_1-R_2)}$$

โดย WVTR = การซึมผ่านของไอน้ำ (กรัม.มิลลิเมตรต่อตารางเมตร.ชั่วโมง.กิโลปาสคาล)

S = ความดันไอของไอน้ำที่อิ่มตัวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

= 23.73 มิลลิเมตรปรอท (1.333 × 10^2 ปาสคาล = 1 มิลลิเมตรปรอท)

R_1 = ความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศในโถดูดความชื้น = 0%RH

R_2 = ความชื้นสัมพัทธ์ภายในถ้วยทดสอบ = 100%RH

ปริมาณความชื้น (moisture content) (Mehyar & Han, 2004)

นำแผ่นฟิล์มมาตัดให้มีขนาด 5×5 เซนติเมตร นำไปชั่งน้ำหนักอย่างละเอียดก่อนนำไปอบด้วยตู้อบความร้อนยี่ห้อ SHEL LAB รุ่น 1375 FX ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักฟิล์มหลังอบ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และคำนวณปริมาณความชื้นจากความแตกต่างของน้ำหนักฟิล์ม

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{นน.ก่อนอบเริ่มต้น - นน.หลังอบเริ่มต้น}}{\text{นน.ก่อนอบเริ่มต้น}} \times 100$$

การละลายของฟิล์มโปรตีน (film solubility) (วารินทร์ พิมพา, 2547; Mehyar & Han, 2004)

นำฟิล์มที่อบแล้วจากการวัดปริมาณความชื้นมาชั่งน้ำหนักเริ่มต้นของฟิล์มอย่างละเอียดด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTER-TELEDO รุ่น AG 204 ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง แล้วนำไปเขย่าด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่ายี่ห้อ POLY SCIENCE รุ่น 25 L-M ที่อุณหภูมิห้อง (25±5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นฟิล์มที่เหลือมาซับน้ำให้แห้ง และชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักสุดท้ายที่แน่นอน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ นำไปคำนวณร้อยละของการละลายของฟิล์ม (Solubility) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการละลาย} = \frac{\text{นน.หลังอบเริ่มต้น - นน.หลังอบคงที่}}{\text{นน.หลังอบเริ่มต้น}} \times 100$$

การวัดสี (color measurement)

ทำการวัดนำแผ่นฟิล์มมาตัดเป็นวงกลมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร โดยใช้เครื่อง Hunter Lab ยี่ห้อ HUNTER LAB รุ่น DP 9000 ซึ่งบันทึกค่าในระบบ CIE Lab วัดค่า L*, a* และ b* แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าความสว่างคือค่า L* และค่าความเข้มของสีคือ ค่า chroma และความแตกต่างของสีคือค่า ΔE

ค่า L* คือ ค่าแสดงความสว่างของสี ซึ่งค่า L มีค่า 0–100 ถ้าค่า L มากแสดงว่าสีสว่างมาก โดยที่ระดับ L เป็น 0 จะเป็นสีดำ

ค่า a* คือ ค่าแสดงระดับสีแดง-เขียว เมื่อค่า a เป็นบวกจะแสดงลักษณะสีแดง และเมื่อค่า a เป็นลบจะแสดงลักษณะสีเขียว โดยที่เมื่อค่าห่างจาก 0 มาก แสดงถึงค่าสีแดงหรือสีเขียวมากขึ้น

ค่า b* คือ ค่าแสดงระดับสีเหลือง-น้ำเงิน เมื่อค่า b มีค่าเป็นบวกแสดงลักษณะสีเหลือง และเมื่อค่า b เป็นลบจะแสดงลักษณะสีน้ำเงิน โดยที่เมื่อค่าห่างจาก 0 มากแสดงถึงค่าสีเหลืองหรือน้ำเงินมากขึ้น

ค่า ΔE คือ ค่าที่แสดงความแตกต่างรวมของสีระหว่างสีของตัวอย่างเริ่มต้น และสีของตัวอย่างสุดท้าย ถ้าค่า ΔE มีค่ามาก แสดงว่าวัตถุมีสีเข้มจึงมีค่าความแตกต่างรวมของสีมาก

ค่าความแตกต่างของสี ΔE

$$= \sqrt{(L^*_{\text{เริ่มต้น}}-L^*_{\text{สุดท้าย}})^2 + (a^*_{\text{เริ่มต้น}}-a^*_{\text{สุดท้าย}})^2 + (b^*_{\text{เริ่มต้น}}-b^*_{\text{สุดท้าย}})^2}$$

ลักษณะโครงสร้างจุลภาค

นำตัวอย่างมาทำให้แห้งโดยเก็บไว้ในโถดูดความชื้นอย่างน้อย 48 ชั่วโมง (ถ้าตัวอย่างมีความหนาให้อบให้แห้งก่อนวัด) มาตัดให้มีขนาด 3x5 มิลลิเมตร ฉาบด้วยทองบริสุทธิ์ร้อยละ 99.99 เป็นเวลา 150 วินาที โดยใช้ระดับกระแสไฟฟ้า 18 มิลลิแอม ทำการวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น LEO 1455 โดยใช้หัววัด secondary electron ถ่ายเป็นภาพตัดขวางเอียงทำมุม 30 องศา (cross-section) ที่ระดับกำลังไฟ 10 และ 15 กิโลอิเล็กตรอนโวลต์ กำลังขยาย 3,000 และ 5,000 เท่า

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของพลาสมาโปรตีน

การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C. 1990)

ชั่งตัวอย่างผงพลาสมาโปรตีนให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1.0 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีนของเครื่องวิเคราะห์โปรตีนยี่ห้อ BUCHI รุ่น B435 และใส่ Mixed catalyst ปริมาณ 10 กรัม และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นปริมาณ 20 มิลลิลิตร วางหลอดในเตาย่อยและเปิดสวิทช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย ตั้งอุณหภูมิที่หมายเลข 8 จนได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น 20 นาที และนำไปไทเทรตด้วยสารละลายกรดซัลฟูริค 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)

$$= \frac{(A-B)xNxFx1400.7}{Wx1000}$$

โดย A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับตัวแบลงค์

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มอล)

F = แฟกเตอร์ (ดูจากตารางเท่ากับ 6.25)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

การวิเคราะห์ไขมันโดยวิธี Petroleum ether extraction method (A.O.A.C. 1990)

ทำการเปิดเครื่องทำน้ำเย็น และบดตัวอย่างที่ต้องการจะวิเคราะห์ให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม บนกระดาษกรองและห่อให้มิดชิด จากนั้นนำมาใส่ลงในทิมเบิล (Thimble) อุดด้วยสำลี นำทิมเบิลใส่ใน Soxtec อบบีกเกอร์และชั่งน้ำหนัก (W2) เติมตัวทำละลาย (ปิโตรเลียมอีเทอร์) ลงในบีกเกอร์ประมาณ 170 มิลลิลิตร จากนั้นนำบีกเกอร์เข้าไปใน Soxtec ของเครื่องวิเคราะห์ไขมันยี่ห้อ BUCHI รุ่น B-810 และเปิดเครื่องทำความร้อนเพื่อให้เกิดการกลั่นตัวของปิโตรเลียมอีเทอร์ นานประมาณ 2 ชั่วโมง หรือประมาณ 20 ไซฟ่อน หลังจากสกัดเสร็จแล้วให้ทำการระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออก นำบีกเกอร์ Soxtec ที่มีไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W3) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\%\text{Crude fat} = \frac{(W3-W2)\times 100}{W1}$$

โดย W3 = น้ำหนักบีกเกอร์และไขมันหลังอบ

W2 = น้ำหนักบีกเกอร์

W1 = น้ำหนักตัวอย่าง

การวิเคราะห์เถ้าโดยวิธี Direct method (A.O.A.C. 1990)

นำถ้วยซิลิกาไปเผาในเตาเผายี่ห้อ FISHER รุ่น 10-650-126 อุณหภูมิประมาณ 500 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างพลาสมาโปรตีน 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยซิลิกาที่ทราบน้ำหนักแล้ว (ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวทำให้แห้งบนอ่างควบคุมความร้อนเสียก่อน) และนำไปเผาบน hot plate จนไม่มีควันดำ แล้วจึงนำตัวอย่างใส่ในเตาเผาอุณหภูมิประมาณ 500-550 องศาเซลเซียส (คลอไรด์จะเกิดการระเหยที่อุณหภูมิสูงกว่า 600 องศาเซลเซียส) เผาตัวอย่างจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว (อาจนานถึง 6 ชั่วโมง) ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณร้อยละของเถ้าดังนี้

ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)

$$\%\text{Crude ash} = \frac{(A-B)\times 100}{W}$$

โดย A = น้ำหนักถ้วย + เถ้า
B = น้ำหนักถ้วย
W = น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา

การวิเคราะห์ความชื้น (A.O.A.C. 1990)

เตรียมถ้วยอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นโดยล้างให้สะอาด นำไปอบด้วยตู้อบความร้อนยี่ห้อ SHEL LAB รุ่น 1375 FX ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำออกจากเตาอบเก็บไว้ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมนำเข้าไปในตู้อบ เปิดฝาทิ้งไว้ในตู้อบด้วย และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปิดฝาถ้วยอลูมิเนียมทันทีขณะอยู่ในตู้อบ เมื่ออบเสร็จแล้ว และนำไปทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน และนำถ้วยตัวอย่างกลับเข้าไปอบต่อในเตาอบ จนกระทั่งได้น้ำหนักสุดท้ายที่ไม่เปลี่ยนแปลง

ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ - น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

การประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ฟิล์มในการเก็บรักษาอาหาร

การเตรียมตัวอย่างขนมเค้ก

การเตรียมขนมเค้กจะเตรียมในห้องปฏิบัติการของภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โดยมีสูตรดังนี้

ไข่ไก่	200	กรัม
เนย	325	กรัม
น้ำตาล	200	กรัม
แป้งสาลี	237	กรัม
นมข้นจืด	82.5	กรัม
น้ำสะอาด	82.5	กรัม

ตีผสมให้เข้ากัน นำมาเทใส่ถาดพิมพ์สี่เหลี่ยมที่มีขนาด 30x30 เซนติเมตร และนำไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เทออกจากถาดพิมพ์ทิ้งไว้ให้เย็น และตัดชิ้นขนมเค้กให้มีขนาด 5x3x3 เซนติเมตร/ชิ้น บรรจุลงในภาชนะบรรจุที่เป็นถ้วยพลาสติกทรงกลม นำแผ่นฟิล์มที่

ลอกออกจากเพลทพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร มาปิดบริเวณปากถ้วยให้แนบสนิท

การศึกษาผลของการใช้ฟิล์มพลาสมาโปรตีนในการห่อหุ้มขนมเค้ก

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randommized design) ทำการศึกษา 1 ปัจจัย คือ ชนิดของฟิล์มพลาสมาโปรตีน 3 ชนิด คือ

1. ฟิล์มพลาสมาโปรตีน
2. ฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่เติมเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 2
3. ฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่เติมทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 2

โดยฟิล์มพลาสมาโปรตีนจะใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ร่วมกับพอลิเอทิลีนไกลคอล 400 ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นพลาสติไซเซอร์ และเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60±5) เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพขนมเค้กที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ชนิด กับฟิล์มพอลิไวนิลคลอไรด์ (Polyvinyl chloride; PVC) และขนมเค้กชุดควบคุมที่ไม่ได้ห่อหุ้ม ทำการสุ่มตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบดังต่อไปนี้

ความแข็งของขนมเค้ก (cake hardness) (Schou et al., 2005)

ตรวจวัดความแข็งโดยสุ่มตรวจทุก ๆ 2 วัน โดยตัดชิ้นขนมเค้กให้มีขนาด 2x2x2 เซนติเมตร นำไปวัดความแน่นเนื้อของขนมเค้กโดยใช้เครื่อง Instron Universal Machine ยี่ห้อ Instron รุ่น 4411 ใช้หัวตัดที่มีความเร็วของหัวตัด (cross head speed) เท่ากับ 100 มิลลิเมตรต่อนาที อ่านค่าที่ได้เป็นหน่วย กิโลกรัมต่อมิลลิเมตร^2

การประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

เตรียมตัวอย่างขนมเค้กโดยใช้ ขนมเค้ก 2 ชิ้นต่อหนึ่งตัวอย่าง ตัดให้มีขนาด 1x1x2 เซนติเมตร สำหรับการประเมินลักษณะเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยทำการประเมินในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ผู้ชิมเป็นนิสิตและบุคลากรทั่วไปของคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวรจำนวน 10 คน

คุณภาพทางจุลินทรีย์ (microbial quality)

สุ่มตัวอย่างขนมเค้กในวันที่ 6 ของการเก็บรักษามาวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ด้วยวิธีพอร์เพลท (pour plate) โดยตรวจ

นับเป็นปริมาณแบคทีเรียพวก mesophile ทั้งพวก aerobe และพวก facultive และปริมาณยีสต์และราด้วยวิธีสเปรดเพลท (spread plate) โดยทำการชั่งขนมเค้กน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีบดด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (stomacher) ยี่ห้อ SEAWARD รุ่น 7021 เป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง 10^{-2} นำตัวอย่างความเจือจางเหมาะสม 3 ระดับ (เช่น 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) มาปฏิบัติดังนี้

วิธีพอร์เพลท (pour plate) ทำโดยถ่ายตัวอย่างขนมเค้กความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ 2 จาน ๆ ละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดนการหมุนจาน รอจนวุ้นแข็งตัว นำไปบ่มเพาะเชื้อโดยวางจานแบบคว่ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีสเปรดเพลท (spread plate) ทำโดยถ่ายตัวอย่างขนมเค้กความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ลงบนอาหาร Rose Bengal Chloramphenical (RBC) Agar ในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ 2 จาน ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อ เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน นำไปบ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องคว่ำจาน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-5 วัน

นับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับโคโลนี (colony counter) ยี่ห้อ STUART รุ่น SCS ต่อจานที่เหมาะสมในช่วง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง คำนวณได้จากความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n/d

โดยที่ n = จำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ของจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 ต่อจาน

d = ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะในจานที่หาค่า n ได้

และรายงานผลในรูป $\log_{10}$ CFU/g

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95