บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุพันธุ์พืช

ผลลำไยพันธุ์ดอที่เก็บเกี่ยวในระยะแก่ทางการค้าชั้นมาตรฐาน A จากสวนเกษตรกรในเขตอำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง นำผลลำไยมาตัดแต่งก้านออก โดยให้มีก้านเหลือติดผลยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร คัดเลือกผลที่มีความสม่ำเสมอกัน ไม่มีตำหนิ ไม่มีรอยแมลงกัด และไม่เน่าเสีย หลังจากนั้นนำมาทดลองทันที

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี (chroma meter) รุ่น CR-300 ยี่ห้อ Minolta ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ 9 และ 10)

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงความสว่าง

- มีค่าความสว่างมากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง
- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

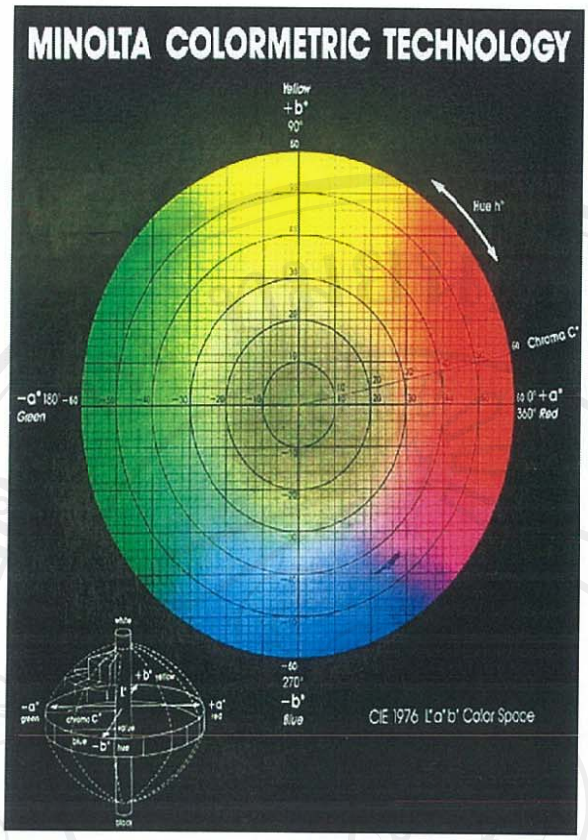
ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง
- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

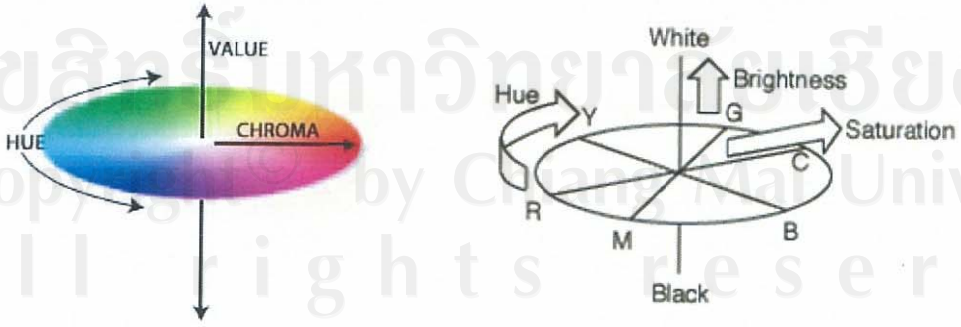
ค่า chroma - มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)
- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

คำนวณค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี ค่า hue angle เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา (McGuire, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 9 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็น L*, a* และ b*



ภาพ 10 ค่าความอิ่มตัวของสี (chroma) และอุณหภูมิของสี (hue angle)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า hue angle เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง 180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว

45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง 225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน

90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว 270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว 315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (hand refractrometer) รุ่น N1 ของบริษัท Atago ประเทศญี่ปุ่น

3. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น 1620C ของบริษัทเบรคไทยอุปกรณ์เคมีภัณฑ์จำกัด และเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP110S ของบริษัท Sartorius Scientific Promotion ประเทศเยอรมณี

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (digital spectrophotometer) รุ่น 6300 ของบริษัท Jenway สหราชอาณาจักร

5. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter) รุ่น HI-221 ของบริษัท Hanna

6. เครื่อง centrifuge รุ่น D-78532 ของบริษัท Tuttingen ประเทศเยอรมณี

7. water bath รุ่น DK-WB002 ของบริษัท Daiki Scienitific ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส รุ่น PAC1000 ของบริษัท Biorad ประเทศ สหรัฐอเมริกา

9. กระจกที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

10. ตู้อบ (oven)

11. ตู้เย็น

12. micropipette ของบริษัท Gilson

13. กระดาษกรอง Whaiman No.1

14. ถาดโฟม

15. ฟิล์มพลาสติก (Polyvinyl Chloride ; PVC) ความหนา 12 ไมครอน

16. โกร่งบด

17. เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวง (cylinder)
- บิวเรต (burette)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปิเปต (pipette)
- แท่งแก้วคนสารละลาย (stirrer)
- กรวยกรอง

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งกรดแอสคอร์บิก (หจก. โอ.วี. เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. สารละลายวุ้นเข้มข้น 1 และ 2% เตรียมโดยชั่งวุ้น (ตรานางเงือก) 10 และ 20 กรัม ละลายในน้ำร้อน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. สารละลายเจลาตินเข้มข้น 2, 4 และ 6% เตรียมโดยชั่งเจลาติน (หจก. โอ.วี. เคมิเคิล แอนด์ ซัพพลาย) 20, 40 และ 60 กรัม ละลายในน้ำร้อน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- สารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกอะซีติก เตรียมโดยเติมกรดอะซีติกเข้มข้น 40 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดเมตาฟอสฟอริก 15 กรัม ลงในสารละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร
- สารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 0.042 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติม 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.05 กรัม ลงในสารละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
- สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกรดแอสอคร์บิก 0.05 กรัม ละลายในสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกอะซีติก ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกอะซีติก ให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐาน จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐานที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไดไฮเดรต 2.492 กรัม และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต 5.616 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับที่ต้องการโดยใช้สารละลายไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เตรียมโดยชั่งไตรโซดียมซิเตรตไดไฮเดรต 14.117 กรัม และกรดซิตริก 0.42 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับที่ต้องการโดยใช้สารละลายไฮโดรคลอริก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

- สารละลายไพโรแกลลอล ความเข้มข้น 1.25% เตรียมโดยชั่งไพโรแกลลอล 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% เตรียมโดยตวงเอทานอล 99.8% ปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 998 มิลลิลิตร

- สารละลายโฟลิน ความเข้มข้น 10% เตรียมโดยตวง Folin-Ciocaltea Reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายฟีนอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง gallic acid 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

- สารละลาย extraction buffer เตรียมโดยชั่ง Tris base 1.2114 กรัม sodium dodecyl sulfate 5 กรัม chaps 0.4 กรัม EDTA 372.24 มิลลิกรัม 1,4-Dithio-DL-theritol 4.6275 มิลลิกรัม phenylmethasulfonyl fluoride 3.484 มิลลิกรัม และ 2-mercaptoethanol 0.4 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 8.8 โดยใช้สารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์

- สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไดไฮเดรต 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 นำสารละลายโซเดียมไดไฮโดร-เจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตรมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอ-ไรด์ 11.7467 กรัม กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความปีนกรด-ด่าง 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) เตรียมโดยนำสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 มา 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสาร Bovine serum albumin (BSA) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นปีเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้มา 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย PBS ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย Coomassie เตรียมโดยชั่งสาร Coomassie brilliant blu R-250 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล 99.8% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

8. สารเคมีที่ใช้หาชนิดของโปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

- สารละลาย acrylamide/bis 30 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย ชั่ง acrylamide 29.2 กรัม และ N,N'-bis- acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.8 เตรียมโดยชั่ง Tris base 54.45 ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 300 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์

- สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 เตรียมโดย ชั่ง Tris base 6 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์

- สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย sample buffer เตรียมโดยตวง สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 1 มิลลิลิตร Glycerol 1.6 มิลลิลิตร สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 1.6 มิลลิลิตร 2-mercaptoethanol 0.4 มิลลิลิตร สารละลาย bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์ 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยในน้ำกลั่นให้ครบ 8 มิลลิลิตร

- สารละลาย electrod buffer (5x) เตรียมโดยชั่ง Tris base 45 กรัม Glycine 216 กรัม และ SDS 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 3,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

- สารละลายตัวอย่าง ผสมสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร กับสารละลายsample buffer 20 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

- สารละลายสีย้อม เตรียมโดยชั่ง coomassie brilliant blue R-250 0.02 กรัม ละลายในเมทานอล 40 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย destainner เตรียมโดยตวงเมทานอล 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้น 140 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 2000 มิลลิลิตร

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของเวลาในการแช่กรดแอสคอร์บิกต่อคุณภาพของลำไยพันธุ์ดอ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 20 ผล ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 1 นาที

กรรมวิธีที่ 3 ผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 ผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 10 นาที

กรรมวิธีที่ 5 ผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 20 นาที

กรรมวิธีที่ 6 ผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ นำผลลำไยมาล้างทำความสะอาด แล้วนำผลลำไยแช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 1, 5, 10, 20 และ 30 นาที และชุดควบคุมคือไม่แช่ผลลำไยในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% จากนั้นผึ่งให้ผิวนอกแห้งที่อุณหภูมิห้อง นำผลลำไยบรรจุลงในถาดโฟมหุ้มด้วยฟิล์ม polyvinyl chloride แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของผลลำไยทุก 3 วัน ดังนี้

1. อายุการเก็บรักษา

อายุการเก็บรักษาของผลลำไย ประเมินจากระดับคะแนนการเน่าเสียของผลลำไย ≥ 3 และ/หรือ ระดับคะแนนการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผิวเปลือกด้านนอก ≥ 3 และ/หรือ ระดับคะแนนกลิ่น ≤ 2 และ/หรือ ระดับคะแนนการยอมรับในการบริโภคโดยรวม ≤ 2 ถือว่าหมดอายุการเก็บรักษา

2. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

2.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด

โดยนำผลลำไยที่ทดลองมาชั่งในวันแรกของการทดลอง และวันที่ทำการทดลอง ด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด จากสูตร (AOAC, 1984)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A = น้ำหนักตัวอย่างวันแรกที่ทำการทดลอง (กรัม)

B = น้ำหนักตัวอย่างวันที่ทำการทดลอง (กรัม)

2.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเปลือก เนื้อ และเมล็ด

นำผลลำไยในแต่ละกรรมวิธีแกะแยกส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ด ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งอีกครั้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งจากสูตร (AOAC, 1984)

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง} = \frac{B}{A} \times 100$$

A = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

B = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกด้านนอก ด้านใน และสีเนื้อ

วัดสีเปลือกด้านนอก ด้านใน และสีเนื้อวัดโดยใช้เครื่อง Chromameter รุ่น CR-300 ยี่ห้อ Minolta แหล่งกำเนิดแสง D65 ค่าที่ได้แสดงเป็น L*, a* และ b* คำนวณค่า chroma และ hue angle จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$\text{chroma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \qquad \text{hue angle} = \text{arctangent}\ (b^*/a^*)$$

3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

3.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

โดยนำเนื้อลำไยมาคั้นเอาเฉพาะน้ำ แล้วนำมาวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่อง hand refractometer อ่านค่าเป็น °บริกซ์ โดยก่อนใช้ปรับค่าให้มีค่าเท่ากับ 0 ด้วยน้ำกลั่น

3.2 ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีโดยดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (1998) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

น้ำคั้นลำไย 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่

↓

เติมสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริกอะซีติก 5 มิลลิลิตร

↓

นำสารละลายไปไทเทรตกับสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐานจนถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายจะมีสีชมพูนาน 15 วินาที แล้ว

คำนวณหาปริมาณวิตามินซี ตามสูตรดังนี้

$$\text{mg ascorbic acid/100 ml juice} = (X-B)(F/E)(V/Y)x100$$

X = ปริมาณของ dye solution ที่ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาณของ dye solution ที่ไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

F = mg. equivalent ascorbic acid /1 ml dye solution

E = ปริมาณ standard ascorbic acid ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

V = ปริมาณสารละลายที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

Y = ปริมาณสารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ PPO

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Selvaraj and Kumar (1989) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำเปลือกลำไย 5 กรัม แช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดในโกร่งบด

↓

ชั่งเปลือกลำไยที่บดละเอียด 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่

↓

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓

เก็บไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓

กรองผ่านผ้ากรอง 4 ชั้น

↓

นำไปตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้คือ crude enzyme

↓

crude enzyme 1 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลายไพโรแกลลอลความเข้มข้น 1.25 % ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 0.05 $absorbance_{450}$ ที่เปลี่ยนไป/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอล

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Singleton and Rossi (1965) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำเปลือกลำไย 3 กรัม แช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดในโกร่งบด

↓

เติมเอทานอล 80% ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน

↓

นำไปตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓

ดูดส่วนใสมาเจือจาง 10 เท่า

↓

นำสารละลายมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายโฟลิน ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที

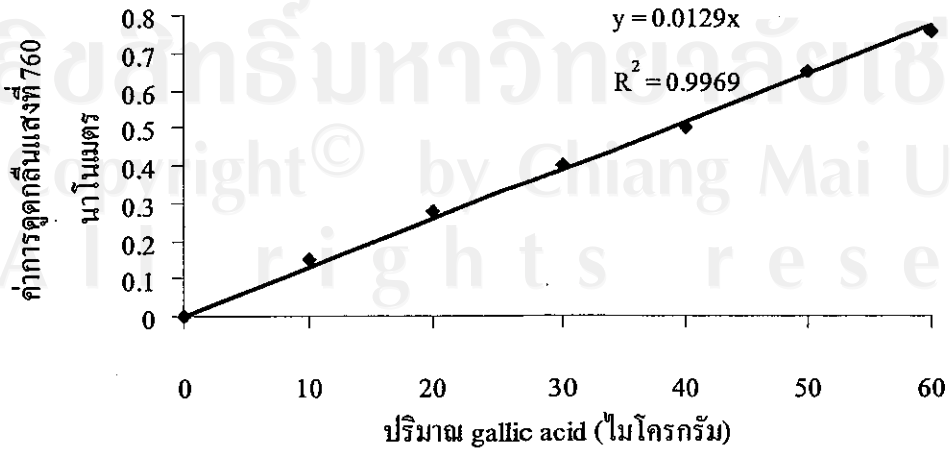
เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

↓ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 ปริมาณโปรตีนในเนื้อ

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อลำไยโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Braford (1976) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

เนื้อลำไย 3 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่งบด

↓ เติม polyvinylpyrolidone 0.12 กรัม

เติมสารละลาย extraction buffer 6 มิลิลิตร

↓

นำไปตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนใสที่ได้คือ สารสกัดหยาบ

↓

สารสกัดหยาบ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม PBS ให้ครบ 300 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

↓

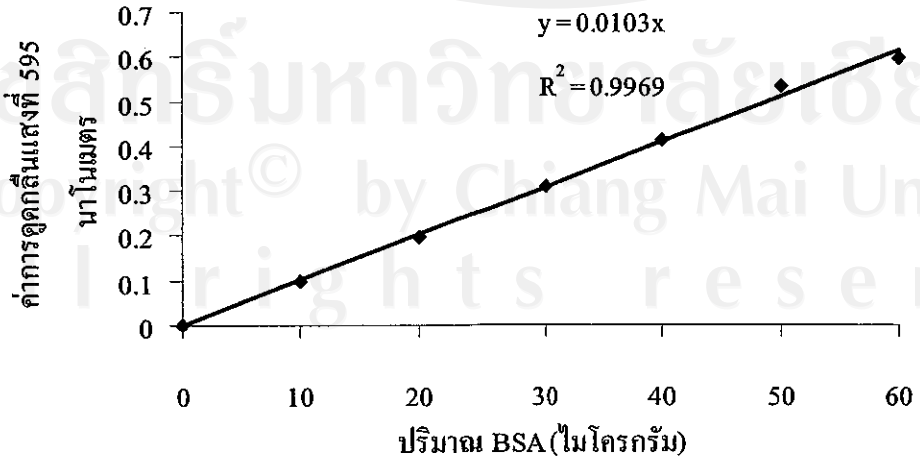
วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 ชนิดของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

การเตรียมเจล

เตรียม separating gel 12 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

สารละลาย Acrylamide/bis	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.35	มิลลิลิตร
Tris-Hcl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	100	ไมโครลิตร
Ammonium persulfate เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	50	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	มิลลิลิตร

การทำอิเล็กโตรโฟรีซีส

ประกอบกระจกที่ใช้ทำอิเล็กโตรโฟรีซีส 2 แผ่น เข้าด้วยกัน

↓

เติม separating gel ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก

↓

รอให้เจลแข็งประมาณ 30 นาที

↓

ประกอบกระจกเท่ากับ chamber ส่วนบน นำไปใส่ใน chamber ส่วนล่าง ที่มี electrod buffer ครึ่งหนึ่ง

↓

เท electrod buffer ลงใน chamber ส่วนบนให้เต็ม

↓

ใส่สารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงใน stacking gel

↓

ต่อสายไฟจากเครื่องไฟฟ้ากระแสตรงเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส เปิดสวิทส์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมปร์ จนกระทั่งสีของ bromophenol blue วิ่งลงมาห่างจากขอบกระจกด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร

↓

แกะแผ่นเจลใส่กล่องพลาสติก เทสารละลายสีย้อมลงไปให้ท่วม เขย่านาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

↓

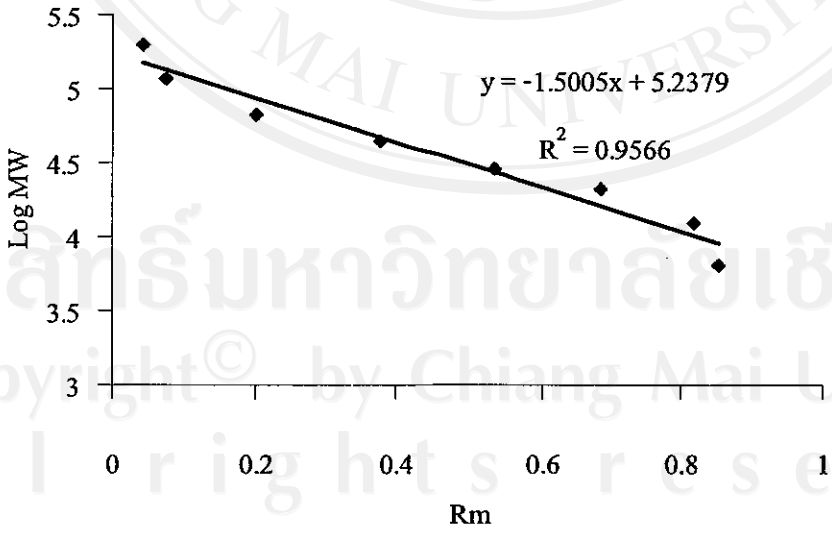
เปลี่ยนสารละลายในกล่องพลาสติกเป็นสารละลาย destainner

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

วัดการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนจากเนื้อลำไยเพื่อคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแถบจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 13)

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, Rm) = ระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ bromophenol blue เคลื่อนที่

นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดมาเขียนกราฟกับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 13) จากนั้นนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบโปรตีนจากเนื้อลำไยไปอ่านค่าเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแถบจากกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 13 กราฟความสัมพันธ์ของค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า Rm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 6 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

ชนิดของโปรตีน	แหล่งที่มา	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)
Myosin	Bovin	200
β-galactosidase	*E. coli* (recombination)	116
Serum albumin	Bovine	67
Ovalbumin	Chicken egg	45
Carbonic anhydrase	Bovine erythrocytes	29
Trypsin inhibitor	Soybean	21
Lysozyme	Chicken egg	12.5
Aprotinin	Bovine lungs	6.5

4. การประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัส

4.1 การเน่าเสีย

บันทึกการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษา โดยการให้คะแนนตามระดับความรุนแรงของการเน่าเสีย ซึ่งแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

1 = ไม่เกิดการเน่าเสีย

2 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดการเน่าเสียตั้งแต่ 1-25% ของพื้นที่ผล

3 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดการเน่าเสียตั้งแต่ 26-50% ของพื้นที่ผล

4 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดการเน่าเสียตั้งแต่ 51-75% ของพื้นที่ผล

5 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดการเน่าเสียตั้งแต่ 76-100% ของพื้นที่ผล

4.2 การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผิวเปลือกด้านนอก

ประเมินโดยการให้คะแนน ซึ่งแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

1 = ผิวเปลือกด้านนอกไม่เกิดสีน้ำตาล

2 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดสีน้ำตาล 1-25% ของพื้นที่ผล

3 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดสีน้ำตาล 26-50% ของพื้นที่ผล

4 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดสีน้ำตาล 51-75% ของพื้นที่ผล

5 = ผิวเปลือกด้านนอกเกิดสีน้ำตาล 76-100% ของพื้นที่ผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 กลิ่น

ประเมินโดยการให้คะแนน ซึ่งแบ่งคะแนนออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้

1 = มีกลิ่นผิดปกติ กลิ่นไม่พึงประสงค์

2 = มีไม่มีกลิ่นของลำไย

3 = มีกลิ่นปกติ (กลิ่นลำไยสด) ไม่มีกลิ่นแปลกปลอมไม่พึงประสงค์

4.4 การยอมรับในการบริโภคโดยรวม

ประเมินโดยการให้คะแนน ซึ่งแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด

2 = ไม่ชอบ

3 = เฉยๆ

4 = ชอบ

5 = ชอบมากที่สุด

การทดลองที่ 2 ผลของสารเคลือบผิวที่บริโภคได้ต่อคุณภาพลำไยพันธุ์ดอ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 20 ผล ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 1%

กรรมวิธีที่ 3 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 2%

กรรมวิธีที่ 4 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 2%

กรรมวิธีที่ 5 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 4%

กรรมวิธีที่ 6 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 6%

วิธีการ นำผลลำไยมาล้างทำความสะอาด แช่ผลลำไยในสารละลายกรดแอสคอร์บิกเข้มข้น 1% นาน 1 นาที จากนั้นนำผลลำไยไปเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 1 และ 2% สารละลายเจลาตินเข้มข้น 2, 4 และ 6% ส่วนชุดควบคุมคือไม่เคลือบผิว จากนั้นผึ่งให้ผิวนอกแห้งที่อุณหภูมิห้อง บรรจุผลลำไยลงในถาดโฟม หุ้มด้วยฟิล์ม polyvinyl chloride แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของผลลำไยทุก 3 วัน ดังนี้

1. อายุการเก็บรักษา
2. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ
    2.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด
    2.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งเปลือก เนื้อ และเมล็ด
    2.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกด้านนอก ด้านใน และสีเนื้อ
3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี
    3.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้
    3.2 ปริมาณวิตามินซี
    3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ PPO
    3.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอล
    3.5 ปริมาณโปรตีนในเนื้อ
4. การประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัส
    4.1 การเน่าเสีย
    4.2 การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของผิวเปลือกด้านนอก
    4.3 กลิ่น
    4.4 การยอมรับในการบริโภคโดยรวม

การทดลองที่ 3 ผลของสารเคลือบผิวที่บริโภคได้ต่อคุณภาพลำไยพันธุ์ดอแบบแกะเปลือก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) มี 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผลลำไย 20 ผล ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 1%

กรรมวิธีที่ 3 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 2%

กรรมวิธีที่ 4 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 2%

กรรมวิธีที่ 5 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 4%

กรรมวิธีที่ 6 ผลลำไยเคลือบผิวด้วยสารละลายเจลาตินเข้มข้น 6%

วิธีการ นำผลลำไยมาแกะเปลือกออก ล้างทำความสะอาด ทดลองโดยเคลือบผิวด้วยสารละลายวุ้นเข้มข้น 1 และ 2% สารละลายเจลาตินเข้มข้น 2, 4 และ 6% ส่วนชุดควบคุมคือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เคลือบผิว จากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง บรรจุผลลำไยลงในถาดโฟม หุ้มด้วยฟิล์ม polyvinyl chloride แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของผลลำไยทุกวัน ดังนี้

1. อายุการเก็บรักษา
2. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ
    - 2.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด
    - 2.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเนื้อและเมล็ด
    - 2.3 การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อ
3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี
    - 3.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้
    - 3.2 ปริมาณวิตามินซี
    - 3.3 ปริมาณโปรตีนในเนื้อ
4. การประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัส
    - 4.1 การเน่าเสีย
    - 4.2 กลิ่น
    - 4.3 การยอมรับในการบริโภคโดยรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved