บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.วัสดุพันธุ์พืช

กะหล่ำปลีพันธุ์ RP1 ที่ปลูกในระบบอินทรีย์และที่ปลูกในระบบปกติ จากแหล่งปลูกสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในระยะบริบูรณ์ มีน้ำหนักเฉลี่ย 400-600 กรัมต่อหัว ส่งมาที่งานคัดบรรจุมูลนิธิโครงการหลวง แล้วส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรถขนส่งของมูลนิธิโครงการหลวง ใช้ระยะเวลาตั้งแต่ เก็บเกี่ยวจนกระทั่งเริ่มการทดลองประมาณ 10 ชั่วโมง

2.อุปกรณ์

2.1 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA 3100 P ของบริษัท Sartorius และเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 54 ของบริษัท Mettler Toledo

2.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotrometer) รุ่น U2001 ของบริษัท Hitachi

2.3 เครื่องปั่นผักและผลไม้ (Blender) รุ่น S (648) ของบริษัท Moulinex

2.4 เครื่องปั่น (Spinner) สำหรับสลัดน้ำออกจากใบผัก รุ่น C – 2222 ของบริษัท สรรพสินค้าเซ็นทรัลจำกัด

2.5 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น AS1324 ของบริษัท Email Westinghouse Ply Ltd.

2.6 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น MIR - 553 ของบริษัท Sanyo

2.7 ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น EMO – 900T ของบริษัท Sanyo

2.8 หม้อนึ่งความดันไอสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HL – 300 ของบริษัท Hunley

2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WR10 ของบริษัท Memmert

2.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งอุณหภูมิได้ (Centrifuge) รุ่น D – 78532 Tuttlingen หมุนได้ 18, 000 รอบ/นาที ของบริษัท Hettich

2.11 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน (Hot plate) ของบริษัท Nuova

2.12 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer) รุ่น PR - 101 ของบริษัท ATAGO อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0 - 40 องศาบริกซ์

2.13 กล้องถ่ายรูป รุ่น DSC - W30 ของบริษัท Sony

2.14 นาฬิกาจับเวลารุ่น Sport timer ของบริษัท Casio

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.15 เครื่องวัดสี (Chromameter) รุ่น CR–300 หัววัดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ของบริษัท Minolta ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* มีรายละเอียดดังนี้

L* = The lightness factor (value)

- มีค่าความสว่างมากเมื่อค่าเข้าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อค่าเข้าใกล้ 0

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

a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60 หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma

- มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีจาง
- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

การคำนวณหาค่า chroma เพื่อแสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี

ค่า hue angle (h°)

- เป็นค่าที่แสดงมุมในการตกกระทบของค่า chroma ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 360 องศา ซึ่งจะเป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ

0 - 45 องศา แสดงช่วงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง

45 - 90 องศา แสดงช่วงสีส้มแดงถึงสีเหลือง

90 - 135 องศา แสดงช่วงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว

135 - 180 องศา แสดงช่วงสีเหลืองเขียวถึงเขียว

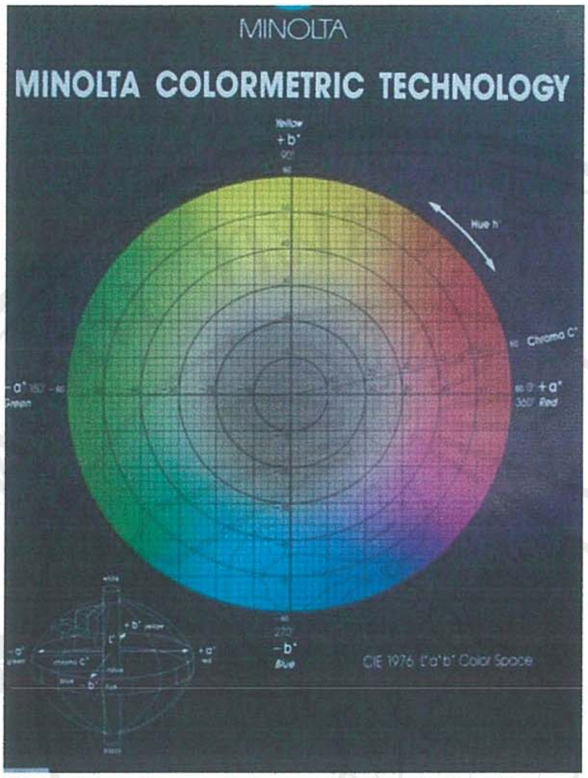
180 - 225 องศา แสดงช่วงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว

225 - 270 องศา แสดงช่วงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

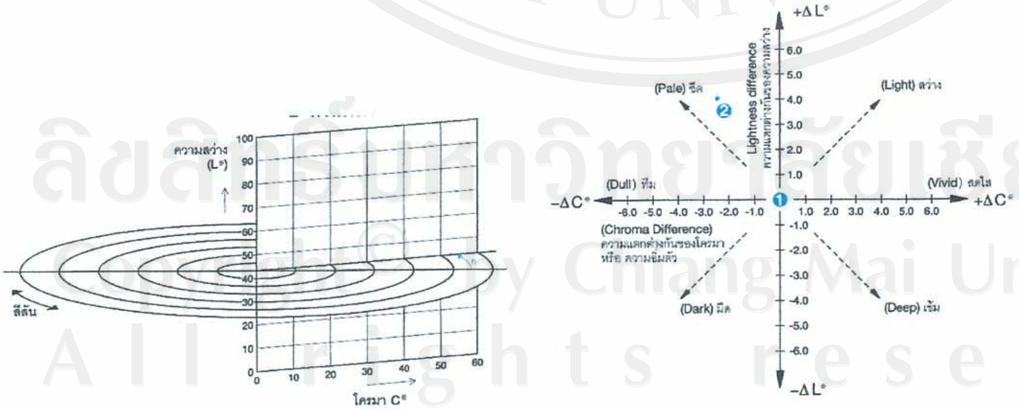
270 - 315 องศา แสดงช่วงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

315 - 360 องศา แสดงช่วงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็นค่า L*, a* และ b*

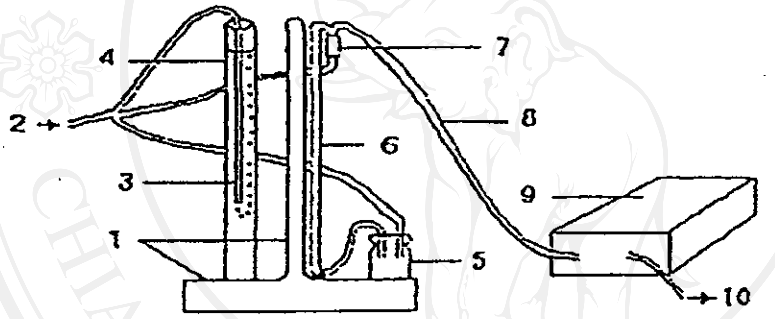


ภาพที่ 2 ค่าความอิ่มตัว (chroma) และความสว่าง (Lightness) ของสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.16 ชุดแผงควบคุมการไหลของอากาศ (flow board) ประกอบด้วย (ภาพ 3)

1. แผงและฐานไม้
2. ทางอากาศเข้า
3. หลอดแก้วระบายอากาศ
4. ขวดแก้วใหญ่บรรจุน้ำเต็ม
5. หลอดแก้ว
6. แคพิลลารี (capillary)
7. หลอดนำก๊าซ
8. ภาชนะบรรจุผลิตผล
9. ทางอากาศออก



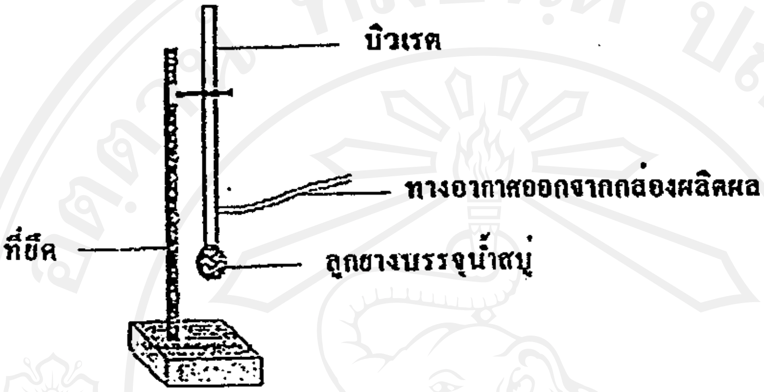
ภาพที่ 3 ชุดแผงควบคุมการไหลของอากาศ

หลักการทำงานของชุดแผงควบคุมการไหลของอากาศ คือ เมื่อให้อากาศจากเครื่องสูบลมผ่านเข้าช่องอากาศเข้า (2) อากาศจะแยกออกเป็น 3 ทาง คือ ผ่านไปเข้าสู่น้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) หรือผ่านเข้าไปในหลอดบรรจุน้ำ (5) หรือออกไปทางหลอดแคพิลลารี (7) แล้วออกสู่ภาชนะบรรจุผลิตผล (9) กรณีที่อากาศผ่านเข้ามามีแรงดันต่ำ อากาศส่วนใหญ่จะไหลไปทางหลอดแคพิลลารี เพราะไม่สามารถดันน้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) หรือในขวดแก้ว (5) ได้ แต่เมื่อเพิ่มความดันของอากาศที่ผ่านเข้ามาให้มากขึ้น อากาศจะออกทางหลอดแคพิลลารีไม่ทัน เพราะมีช่องขนาดเล็ก อากาศจะดันน้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) ให้ต่ำลง และดันน้ำในหลอดแก้ว (5) ขึ้นไปตามหลอดแก้วแสดงระดับความดัน (6) ซึ่งจะสูงเท่ากับระดับความดันของอากาศที่ผ่านเข้ามาในขณะนั้น ถ้าความดันอากาศเพิ่มขึ้นจะดันน้ำในหลอดแก้ว (3) ให้ต่ำลงจนเห็นเป็นฟองอากาศออกไปที่ปลายหลอดแก้วระบายอากาศ (3)

2.17 ชุดวัดอัตราการไหลของอากาศ (air flow meter) (ภาพ 4) ระกอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- ทางอากาศเข้า
- บิวเรต (burette)
- ลูกยางบรรจุน้ำสบู่



ภาพที่ 4 ชุดวัดอัตราการไหลของอากาศ

หลักการทำงานของเครื่อง คือ เมื่อต่อสายยางที่มีอากาศผ่านจากแคพิลลารีในชุดแผงควบคุมอัตราการไหลเข้ากับชุดวัดอัตราการไหลของอากาศแล้ว เมื่อบีบลูกยางทำให้น้ำสบู่ไหลขึ้นไปปิดทางออกอากาศ ขณะที่อากาศไหลออกจากหลอดแคพิลลารีเข้าสู่บิวเรต อากาศจะดันน้ำสบู่ให้เป็นฟองไหลออกไปตามบิวเรต วัดอัตราการไหลของอากาศโดยจับเวลาการเคลื่อนที่ของฟองสบู่แล้วคำนวณเป็นอัตราไหลของอากาศมีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อนาที

2.18 เครื่อง gas chromatography รุ่น GC - 8A ของบริษัท SHIMADZU ประเทศญี่ปุ่น โดยมีรายละเอียดดังนี้

- Detector : Thermal conductivity detector (TCD)
- Column : Molecular Sieve 5A และ Parapak Type N
- Carrier gas : helium, 25 มิลลิลิตร/นาที
- Oven temperature : 110 องศาเซลเซียส
- Injection temperature : 110 องศาเซลเซียส
- Column temperature : 70 องศาเซลเซียส

2.19 ตู้เย็น

2.20 มีดปอกผลไม้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.21 เขียงพลาสติก

2.22 สำลี

2.23 โกร่งบด

2.24 เทอร์โมมิเตอร์

2.25 ขวดน้ำกลั่น

2.26 กล่องโฟม

2.27 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

2.28 กระดาษกรอง Whatman No.1 และ No.4

2.29 ตะกร้า

2.30 กระดาษหนังสือพิมพ์

2.31 ถังน้ำพลาสติก ขนาด 20 ลิตร

2.32 เข็มฉีดยา

2.33 ช้อนตักสารเคมี

2.34 จุกยาง

2.35 กระบอกฉีดน้ำ

2.36 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์
- กรวยกรอง
- กระบอกตวง
- หลอดทดลอง
- ขวดรูปชมพู่
- แท่งแก้ว
- ปิเปต
- จานเพาะเชื้อ
- ขวดแก้ว
- บิวเรต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- สารละลายอะซิโตน (acetone) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ มา 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 2, 6 ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2, 6 dichlorophenol indophenol, SIGMA) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2, 6 ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตกับ 2, 6 ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ (จุดที่มีการเปลี่ยนสี) แล้วบันทึก 2, 6 ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการคำนวณ หาปริมาณวิตามินซี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มา 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 950 มิลลิลิตร

- สารละลาย Folin – Ciocalteus Reagent, Fluka ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวง Folin – Ciocalteus Reagent 100 เปอร์เซ็นต์ มา 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Merck) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนตมา 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลาย Gallic acid มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสาร Gallic acid มา 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และแป้ง

- สารละลาย Zinc acetate, Ajax Finechem ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง Zinc acetate มา 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย Potassium ferrocyanide, Ajax Finechem ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งสาร Potassium ferrocyanide มา 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลาย Phosphotungstic acid, Sigma ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงสารละลาย Phosphotungstic acid มา 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลาย Dinitro salicylic acid reagent (DNS - reagent) เตรียมโดย ชั่ง Sodium hydroxide, Ajax Finechem มา 10 กรัม, Potassium sodium tartrate, Ajax Finechem มา 182 กรัม, Dinitro salicylic acid, Fluka มา 10 กรัม, Phenol, Panrea มา 2 กรัม และ Sodium sulphite, Ajax Finechem มา 0.5 กรัม ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- สารละลาย Soduim hydroxide, Ajax Finechem ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง Soduim hydroxide มา 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (Standard glucose solution, Merck) เตรียมโดยชั่งน้ำตาล Glucose มาตรฐาน มา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid solution, J.T.Baker) ความเข้มข้น 1.5 N เตรียมโดยตวง สารละลายกรดไฮโดรคลอริกมา 124.34 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble protein)

สารละลายที่ใช้สกัดโปรตีนจากกะหล่ำปลี

- สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 โดยการชั่ง Tris (hydroxylmethyl) aminomethane (Merck) น้ำหนัก 6.05 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- สารละลาย Extraction buffer โดยการชั่ง SDS (BIO-RAD) มา 1.5 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5 ประมาณ 30 มิลลิลิตร เติม 2 - mercaptoethanol (BIO - RAD) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Tris - HCL บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5

สารละลายที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี dye binding

ก. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS)

- สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยการชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยการชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Merck) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 โดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยค่อยๆ เติมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พร้อมกับคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนพีเอชของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Merck) น้ำหนัก 11.7467 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS) โดยนำสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข.สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ชั่งโปรตีน bovine serum albumin (BSA; Fluka) มา 0.2500 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร โดยการเติมสารละลาย BPS จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค.สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ชั่ง coomassie brilliant blue G-250 (BIO-RAD) น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ (Merck) ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ (Merck) ลงไป 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ที่มีความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดฟอสฟอริก 10 เปอร์เซ็นต์

สารเคมีที่ใช้หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

- สารละลายบัฟเฟอร์เปบโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารละลายเจือจางตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารเปบโตน (Peptone, Becton and Dickinson Company) มา 1 กรัม และเกลือแกง (Sodium chloride, Becton and Dickinson Company) มา 5 กรัม ละลายสารเปบโตนและเกลือแกง ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดแก้วทนความร้อนปิดจุกด้วยสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90–100 องศาเซลเซียส แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ขวดแก้วทนความร้อนปิดจุกด้วยสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ค่าพีเอชสุดท้าย เท่ากับ 7.0±0.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ 1,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

Pancreatic Digest of Casein	5.0 กรัม
Yeast Extract	2.5 กรัม
Dextrose	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 คุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของกะหล่ำปลีอินทรีย์

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 หัว

ปัจจัยที่ 1 ระบบการผลิตกะหล่ำปลีมี 2 ระบบ คือ กะหล่ำปลีอินทรีย์ และกะหล่ำปลีที่ผลิตในระบบปกติ

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษามี 4 ระดับ คือ 0, 4, 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (25±2 องศาเซลเซียส)

กะหล่ำปลีพันธุ์ RP1 ที่ปลูกในระบบอินทรีย์และที่ปลูกในระบบปกติ จากแหล่งปลูกสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในระยะบริบูรณ์ มีน้ำหนักเฉลี่ย 400-600 กรัมต่อหัว ส่งมาที่งานคัดบรรจุมูลนิธิโครงการหลวง ผ่านกระบวนการตัดแต่งหัวและห่อหัว แล้วส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรถขนส่งของมูลนิธิโครงการหลวง ใช้ระยะเวลาตั้งแต่เก็บเกี่ยวจนกระทั่งเริ่มการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลองประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4, 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ทันที ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมีทุกๆ 2 วัน จนหมดอายุการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

1. เปอร์เซ็นต์ความเสียหาย โดยประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นบนหัวกะหล่ำปลีตามระดับคะแนนดังนี้

ระดับคะแนน 1 หัวมีความสด 81 – 100 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียวสด ไม่เหี่ยว หัวไม่เน่า)

ระดับคะแนน 2 หัวมีความสด 61 – 80 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียว เริ่มเหี่ยว หัวไม่เน่า)

ระดับคะแนน 3 หัวมีความสด 41– 60 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียวเหลือง เหี่ยว หัวเริ่มเน่า)

ระดับคะแนน 4 หัวมีความสด 21– 40 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเหลืองเขียว เหี่ยว หัวเน่า)

ระดับคะแนน 5 หัวมีความสด 0 – 20 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเหลือง เหี่ยวมาก หัวเน่ามาก)

2. การสูญเสียน้ำหนัก

วัดโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA 3100 P แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{[\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังเก็บรักษา}]}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

3. การเปลี่ยนแปลงสี

วัดโดยใช้เครื่อง Chroma meter รุ่น CR–300 โดยวัดบริเวณตรงกลางหัว ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L*, a*, b* แล้วนำมาคำนวณหาค่า chroma และ hue angle จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$\text{Chroma} = (a^* + b^*)^{1/2}$$

$$\text{hue angle} = \text{arctangent}\ (b^*/a^*)$$

4. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid; TSS)

วัดโดยใช้เครื่อง Digital Refractometer รุ่น PR–101 โดยวัดจากน้ำคั้นที่คั้นได้จากกะหล่ำปลี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี โดยวิธี 2, 6-Dichlorophenol-Indophenol Visual Titration (Ranganna, 1986) โดยนำเนื้อกะหล่ำปลีที่ปั่นละเอียดมา 10 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ดูดสารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ (เปลี่ยนเป็นสีชมพูประมาณ 15 วินาที) บันทึกปริมาณ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไปเพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณวิตามินซี โดยเทียบกับปริมาณ 2, 6 - ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไปกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน

สูตรการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

ปริมาตร Indophenol dye a มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)

ปริมาตร Indophenol dye b มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ (b x1)/a มิลลิกรัม (จากตัวอย่าง) เท่ากับ c มิลลิกรัม

สารละลาย 10 มิลลิลิตร มี ascorbic acid	เท่ากับ c มิลลิกรัม
สารละลาย 100 มิลลิลิตร มี ascorbic acid	เท่ากับ (100 x c)/10 มิลลิกรัม
	เท่ากับ d มิลลิกรัม
ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 10 กรัม มี ascorbic acid	เท่ากับ d มิลลิกรัม
ตัวอย่างเนื้อเยื่อ 100 กรัม มี ascorbic acid	เท่ากับ (100 x d)/10 มิลลิกรัม
	เท่ากับ e มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

6. วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีของ Witham *et al.*, (1971)

สุ่มตัวอย่างกะหล่ำปลีที่หั่นละเอียดมา 3 กรัม บดในโกร่งบดให้มีความละเอียดเท่ากัน ขณะบดเติมสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ลงไปเล็กน้อย เพื่อใช้เป็นตัวสกัดคลอโรฟิลล์ออกจากตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยสารละลายอะซิโตนที่ใช้ในการสกัดให้ครบ 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectophotrometer รุ่น U2001 โดยใช้สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์เป็น blank บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสูตร (ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = \frac{[12.7\,(OD_{663}) - 2.69\,(OD_{645})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี} = \frac{[22.9\,(OD_{645}) - 4.68\,(OD_{663})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = \frac{[20.2\,(OD_{645}) + 8.02\,(OD_{663})] \times V}{1000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่อง Spectrophotrometer ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

7. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Ketsa and Attantee (1998) และ Singleton and Rossi (1965) ดังภาพ 1 (ทุกขั้นตอนต้องกระทำในสภาพที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาต่างๆ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สุ่มชั่งตัวอย่างมา 3 กรัม

↓

เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 12 มิลลิลิตร
บดให้ละเอียดที่อุณหภูมิต่ำ

↓

นำสารสกัดที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งอุณหภูมิได้

↓ ความเร็วรอบ 9,100 รอบ/นาที
นาน 20 นาที

ดูดส่วนใสมา 2 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลาย Folin – Ciocalteus Reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Mixer

↓ ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที

เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Mixer

↓ ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมที่ได้โดยเปรียบเทียบกับ
กราฟสารละลายมาตรฐาน Gallic acid
มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้ง

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้ง โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hodge and Hofreiter (1962) และ Khalafalla and Palzkill (1990) ดังแสดงในภาพที่ 6

นำตัวอย่างกะหล่ำปลีที่ปั่นละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน มา 10 กรัม (A)
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลาย Zinc acetate Solution 5 มิลลิลิตร
เติมสารละลาย Potassium Ferrocyanide Solution 5 มิลลิลิตร

↓ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
ปิดจุกและเขย่าเป็นครั้งคราว

กรองเอาเฉพาะส่วนใส โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.4

↓

เติมสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ สารละลาย Zinc acetate Solution 1 มิลลิลิตร + สารละลาย Potassium Ferrocyanide Solution 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร จำนวน 25 มิลลิลิตร

↓ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4

↓ ↓

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร (B)

↓

ดูดสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Dinitro Salicylic Acid Reagent (DNS - reagent) 4 มิลลิลิตร

↓

ส่วนที่เป็นตะกอนติดบนกระดาษกรองนำมาหาปริมาณแป้ง

↓

ริน HCl 1.5 N (70° C) จำนวน 90 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนออกจากกระดาษกรองโดยแบ่งรินเป็น 2 ครั้ง คือ
ครั้งที่ 1 ริน HCl 1.5 N ครึ่งหนึ่ง ล้างตะกอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้มใน water bath (90° C) นาน 30 นาที

↓

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณตามสูตร การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ออกจากกระดาษกรองใส่ใน flask ครั้งที่ 2 รินจำนวนที่เหลือเพื่อล้างตะกอนอีกครั้ง แล้วเทลง flask เดิม

↓

นำไปต้มใน water bath (70 ° C) นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

↓

ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

↓

ปรับสภาพให้เป็นด่างโดยเติมสารละลาย NaOH 20 % จำนวน 27 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลายที่เป็นส่วนผสมของ กรด HCl 1.5 N 1 ส่วน + น้ำกลั่น 2 ส่วน จำนวน 10 มิลลิลิตร

↓

เทลงใน flask ใหม่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

↓

ล้าง flask เดิม ด้วยสารละลาย Phosphotungstic acid 15 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

↓ แล้วเทลงใน flask ใหม่

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร (B)

↓ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

↓

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร อีกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

↓

ดูดสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร +
สารละลาย Dinitro Salicylic Acid Reagent (DNS - reagent)
4 มิลลิลิตร

↓

ต้มใน water bath (90° C) นาน 30 นาที

↓

ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น
575 นาโนเมตร

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณตามสูตร
การหาปริมาณแป้ง

ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณแป้ง

หมายเหตุ: ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี " DNS-method" หลังจากสารละลายเย็นตัวต้องนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันที และถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มากกว่า 0.5 ให้เจือจางตัวอย่างก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

สูตรในการคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และแป้ง

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{K_1B\,(100)(\text{dilution})}{1000A}$$

$$\text{ปริมาณแป้ง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{K_2V\,(100)(\text{dilution})}{1000A}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ K_1 = (Slope) I

K2 = (Slope)(0.9) I

Slope = ค่าที่ได้จากกราฟกลูโครสมาตรฐาน

I = ค่าการดูดกลืนแสง

0.9 = ค่าคงที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง

B = ปริมาณของเหลวทั้งหมดที่ใช้ (ในส่วนใส)

V = ปริมาณของเหลวที่ปรับให้ครบ (ในส่วนตะกอน)

A = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

Dilution = ระดับการเจือจาง

9. อัตราการหายใจ

วัดความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนโดยใช้เครื่อง gas chromatography รุ่น GC- 8A ของบริษัท SHIMADZU โดยนำกะหล่ำปลีน้ำหนักประมาณ 1,000 กรัม บรรจุลงในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 18.7 x 9.5 เซนติเมตร นำกล่องพลาสติกที่บรรจุกะหล่ำปลีต่อกับชุดแผงควบคุมอัตราการไหลของอากาศ ทดสอบการรั่วของอากาศด้วยน้ำสบู่ ตั้งทิ้งไว้ 8 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และออกซิเจนด้วยเครื่อง Gas chromatography โดยสุ่มตัวอย่างแก๊สมาวัดครั้งละ 1 มิลลิลิตร และทำการวัด 2 ครั้ง/ซ้ำ วัดอัตราการหายใจของกะหล่ำปลีทุกๆ 2 วัน จนหมดอายุการเก็บรักษา แล้วนำมาคำนวณอัตราการหายใจ โดยคำนวณจากสูตร (Smith, 1995)

อัตราการหายใจ (มิลลิกรัม CO_2/กิโลกรัม/ชั่วโมง)

$$= \frac{(\%CO_2 - \text{blank}\%CO_2) \text{ X flow rate (ml/min) x } 321750 \text{ mg kg}^{-1}\text{ hr}^{-1}}{\text{weight (g) x } (273 + \text{measured flow rate Temp } ^{\circ}\text{C})}$$

10. หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของกะหล่ำปลี

กำหนดให้กะหล่ำปลีหมดอายุการเก็บรักษาเมื่อมีลักษณะปรากฏที่ระดับคะแนนเท่ากับหรือมากกว่า 3 คะแนน ซึ่งกะหล่ำปลีมีความสดอยู่ 41– 60 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียวเหลือง เหี่ยว หัวเริ่มเน่า)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ปริมาณธาตุอาหารและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดของกะหล่ำปลีอินทรีย์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 2 กรรมวิธี 3 ซ้ำ คือ กะหล่ำปลีที่ผลิตในระบบอินทรีย์ และกะหล่ำปลีที่ผลิตในระบบปกติ

บันทึกผลการทดลอง

1. ปริมาณธาตุไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 1998)

2. ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด โดยวิธี wet - digestion - Flames Rhotometric Method (AOAC, 1998)

3. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด โดยวิธี wet - digestion - Spectrophotometric Molybdovanadophosphate Method (AOAC, 1998)

4. ปริมาณแคลเซียมทั้งหมด โดยวิธี wet - digestion - Atomic Absorption Spectrophotometric Metohod (AOAC, 1998)

5. ปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมด โดยวิธี wet - digestion - Atomic Absorption Spectrophotometric Metohod (AOAC, 1998)

6. ปริมาณเหล็กทั้งหมด โดยวิธี wet - digestion - Atomic Absorption Spectrophotometric Metohod (AOAC, 1998)

7. ปริมาณโบรอนทั้งหมด ตามวิธีการของ Lohse (1982)

8. ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble protein) โดยวิธี dye binding (Copeland, 1993)

ก. วิธีการสกัดโปรตีนจากกะหล่ำปลี ชั่งกะหล่ำปลีที่สับเป็นชิ้นขนาดเล็กตัวอย่างละ 3 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งที่แช่เย็นค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส โดยบดร่วมกับไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม extraction buffer (SDS 1.5 % (W/V) ที่มี 2 - mercaptoethanol 10 % (W/V) และ 0.5 M Tris - HCL buffer pH 7.5) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที ปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที รินเอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาดเล็กแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป สารสกัดที่ได้จากกะหล่ำปลีเรียกว่า สารสกัดหยาบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BPS) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ [phosphate buffer saline (PBS)] ลงในหลอดแต่ละหลอดโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (สารสกัดหยาบ) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ [phosphate buffer saline (PBS)] โดยให้ปริมาณรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย coomassie brilliant blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

การทดลองที่ 3 คุณภาพทางกายภาพและเคมีของกะหล่ำปลีหั่นชิ้นที่ผลิตในระบบอินทรีย์

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย 3 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1 ระบบการผลิตกะหล่ำปลี คือ กะหล่ำปลีที่ปลูกในระบบอินทรีย์ และกะหล่ำปลีที่ปลูกในระบบปกติ

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา 3 อุณหภูมิ คือ 0, 4 และ 8 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

กะหล่ำปลีพันธุ์ RP1 ที่ปลูกในระบบอินทรีย์และที่ปลูกในระบบปกติ จากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในระยะบริบูรณ์ มีน้ำหนักเฉลี่ย 400-600 กรัมต่อหัว นำกะหล่ำปลีมาหั่นชิ้นให้มีขนาดประมาณ 0.3 x 8 เซนติเมตร หลังจากนั้นสุ่มนำกะหล่ำปลีหั่นชิ้นน้ำหนัก 150 กรัม จุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ความเข้มข้น 100 ppm นาน 10 วินาที เพื่อทำความสะอาด จากนั้นทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องปั่น แล้วนำมาบรรจุในถาดโฟมหุ้มด้วย แผ่นพลาสติก PVC แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 8 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80-85 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมีทุกวัน จนหมดอายุการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

1. การเกิดสีน้ำตาลที่รอยตัด

ระดับคะแนนที่ 5 คือ เกิดสีน้ำตาลมากที่สุด: สีสนิมเข้มปนน้ำตาล

ระดับคะแนนที่ 4 คือ เกิดสีน้ำตาลมาก: สีสนิมปนน้ำตาล

ระดับคะแนนที่ 3 คือ เกิดสีน้ำตาลปานกลาง: สีน้ำตาลปนเหลือง

ระดับคะแนนที่ 2 คือ เกิดสีน้ำตาลเล็กน้อย: สีเหลืองอ่อน

ระดับคะแนนที่ 1 คือ ไม่เกิดสีน้ำตาล

2. การเกิดกลิ่นผิดปกติ

ระดับคะแนนที่ 2 คือ เกิดกลิ่นผิดปกติ

ระดับคะแนนที่ 1 คือ ไม่เกิดกลิ่นผิดปกติ

3. ความเหนียว

ระดับคะแนนที่ 2 คือ ความเหนียวเพิ่มขึ้น

ระดับคะแนนที่ 1 คือ ความเหนียวคงเดิม

ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (total microbial count) ตามวิธีการของ Kiss (1984)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นหนัก 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปบโตน จำนวน 200 มิลลิลิตรได้สารละลายตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นที่มีความเจือจางเป็น $2x10^{-1}$ ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปบโตนอยู่แล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น $2x10^{-2}$ ทำการเจือจางตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นต่อไปเรื่อยๆ ตามวิธีข้างต้น จนได้สารละลายตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นที่มีความเจือจางที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใส่สารละลายตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นที่มีความเจือจางในระดับต่างๆ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีการฆ่าเชื้อแล้ว โดยสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar ที่หลอมเหลวอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้นอยู่ ผสมให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ปิดผนึกรอบด้วยพาราฟิล์มแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ สำหรับชุดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปบโตนแทนสารละลายตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นชิ้น นำจานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 48±3 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อเฉพาะจานที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวนหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ จำนวนโคโลนีต่อกรัมน้ำหนักสด ($\log_{10}$ CFU/100 g)

หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของกะหล่ำปลีหั่นชิ้น

กำหนดให้กะหล่ำปลีหั่นชิ้นหมดอายุการเก็บรักษาเมื่อการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส มีคะแนนการเกิดสีน้ำตาลที่รอยตัดเท่ากับหรือมากกว่า 3 คะแนน มีคะแนนการเกิดกลิ่นผิดปกติเท่ากับ 2 คะแนน และมีคะแนนการสูญเสียความกรอบเท่ากับ 2 คะแนน

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า least significant difference ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved