บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลองเป็นผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก (*Mangifera indica* L., cv. Maha-Chanok) ที่ซื้อจากตลาดสันป่าข่อย อ. เมือง จ. เชียงใหม่ เมื่อวันที่ 12 มิถุนายน พ.ศ. 2546 เป็นผลมะม่วงที่มีระยะสุกทางการค้า เปลือกมีสีเหลืองมากกว่า 80% มีน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 330 - 400 กรัม โดยนำผลมะม่วงมาแปรรูปและแช่เยือกแข็งโดยวิธีแช่แข็งแบบรวดเร็ว (Individual Quick Freezing, IQF) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุด้วยถุงอลูมิเนียมฟอยด์ (NYLON/PE/AI/L-LDPE ขนาดกว้าง × ยาว : 23.0 × 28.0 เซนติเมตร ผลิตโดยบริษัทสตรองแพ็ค จำกัด กรุงเทพ) ที่บริษัทเชียงใหม่โฟรเซ่นฟูดส์ จำกัด (มหาชน) เมื่อวันที่ 16 มิถุนายน พ.ศ. 2546 แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมเนื้อมะม่วงสุกก่อนการแช่เยือกแข็ง

ก) สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอรีนความเข้มข้น 20, 200 และ 300 ส่วนต่อล้านส่วน)

ข) สารละลายผสมกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0% เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก ("เวชวิทย์" Citric acid, เกรดอาหาร, เอส.เค.เทรดดิ้ง, ประเทศไทย) มาจำนวน 200 กรัม และชั่งแคลเซียมคลอไรด์ ("เวชวิทย์" Calcium chloride-2-hydrate, เกรดอาหาร, เอส.เค.เทรดดิ้ง, ประเทศไทย) มาจำนวน 400 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 20 ลิตร

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ก) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท ("Merck" Sodium dihydrogen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany, $NaH_2PO_4.H_2O$, MW = 137.99 g/mol, ความบริสุทธิ์ = 99.0-102%) จำนวน 7.8005 กรัม ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany) ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ("Merck" Disodium hydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany, $Na_2HPO_4.2H_2O$, MW= 177.99 g/mol, ความบริสุทธิ์ >99.5%) จำนวน 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.5 M Sodium phosphate buffer pH 6.2) เตรียมโดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากข้อ ก) 100 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากข้อ ข) พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2

ง) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ ("Merck" Sodium chloride, AR Grade, E. Merck, Germany, NaCl, MW = 58.44 g/mol, ความบริสุทธิ์ > 99.5%) จำนวน 11.7467 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) การเตรียมสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยนำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (จากข้อ ง) จำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (จากข้อ ค) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ก) สารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซีเตต-แอนไฮดรัส ("Merck" Sodium acetate, AR Grade, E. Merck, Germany, CH_3COONa, MW = 82.04 g/mol, ความบริสุทธิ์ > 98.0%) จำนวน 0.8377 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) กรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตกรดอะซีติก ("Merck" Acetic acid glacial, AR Grade, E. Merck, Germany) ปริมาตร 0.57 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ (0.1 M Sodium acetate buffer pH = 6.0) เตรียมโดยนำสารละลายโซเดียมอะซีเตต (จากข้อ ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดอะซีติก (จากข้อ ข) พร้อมคนสารละลายผสมตลอดเวลา จนสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 6.0

ง) สารละลายกัวอะคอลความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งกัวอะคอล ("Fluka" Guaiacal, AR Grade, Fluka, Switzerland, $C_7H_8O_2$, MW = 124.14 g/mol, ความบริสุทธิ์ > 98.0%) จำนวน 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% (Hydrogen peroxide 30% m/m in water, AR Grade, Carlo Erba Reagent, Germany) จำนวน 3.33 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

ฉ) การเตรียมสารละลายสารเริ่มต้นของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เตรียมโดยนำสารละลายกัวอะคอลความเข้มข้น 1% (จากข้อ ง) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ (จากข้อ ค) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% (จากข้อ จ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันเติมน้ำกลั่นลงไป และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ก) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท ("Merck" Sodium dihydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany, $NaH_2PO_4 . H_2O$, MW = 137.99 g/mol, ความบริสุทธิ์ = 99.0-102%) จำนวน 6.970 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ("Merck" Disodium hydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany, $Na_2HPO_4.2H_2O$, MW= 177.99 g/mol, ความบริสุทธิ์ > 99.5%) จำนวน 9.050 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมฟอสเฟต (0.2 M Sodium phosphate buffer pH 6.5) เตรียมโดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากข้อ ก) มา 50 มิลลิลิตร และค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (จากข้อ ข) พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

ง) สารละลายแคทิคอลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งสารไพโรแคทิคอล ("Fluka" Pyrocatechol, HPLC Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A., $C_6H_6O_6$, MW = 110.11 g/mol, ความบริสุทธิ์ > 98.0%) จำนวน 2.81 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

*สารละลายที่ใช้สกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง (freshly solution)

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

3.2.5.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ("Fluka" Bovine Serum Albumin, BSA, AR Grade, Fluka, Switzerland) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมได้โดย

ก) สารละลาย stock ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง BSA มาจำนวน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลาย working ของสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมโดยปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (จากข้อ ก) จำนวน 0.50 มิลลิลิตร ละลายด้วยสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ (สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์) แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.5.2 สารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3.2.5.3 สารละลายสีย้อม เตรียมโดยชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 ("Fluka" Coomassie brilliant blue G-250, AR Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.) จำนวน 0.0125 กรัมละลายด้วยเอทานอล ("สยามเอทานอลอุตสาหกรรม จำกัด" Ethanol, Food Grade, อยุธยา, Thailand) ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้สารละลายสีย้อมละลายให้เข้ากัน เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% ("Merck" *ortho*-phosphoric acid 85%, AR Grade, E. Merck, Germany) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3.2.6 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ("Merck" Sodium hydroxide, NaOH, AR Grade, E. Merck, Germany) มาจำนวน 4 กรัม ใช้เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany) ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน Potassium hydrogen phthalate ("Merck" $C_5H_8KO_4$, AR Grade, E. Merck, Germany) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

3.2.7 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ก) สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซีเตต ("Baker" Zinc acetate dehydrate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซีติก ("Merck" Acetic acid glacial, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ ("Ajax Finechem" Potassium ferrocyanide, AR Grade, Asia Pecific Specialty, Australia) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค) สารละลาย Fehling No.1 เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ("Baker" Copper sulphate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ง) สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จำนวน 100 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต ("Baker" Potassium sodium tartrate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) สารละลายเมทิลีนบูล ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยละลายเมทิลีนบูล ("Merck" Methylene blue, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ฉ) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ("Merck" Hydrochloric Acid, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 564.33 มิลลิลิตร ค่อยๆ รินกรดลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ช) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 นอร์มัล เตรียมโดยละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ จำนวน 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3.2.8 สารเคมีในการสร้างกราฟมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

ก) เบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน ("Fluka" Standard β-carotene, Sigma-Aldrich, U.S.A.)

ข) คลอโรฟอร์ม ("Merck" Chloroform, AR Grade, E. Merck, Germany)

ค) อะซีโตน ("Baker" Acetone, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

ง) เฮกเซน ("Baker " Hexane, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

ฉ) สารละลายผสมของอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน เตรียมโดยปิเปตอะซีโตนจำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.9 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณแคโรทีนอยด์

ก) โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ("Merck" Sodium sulphate anhydrous, Lab Grade, E. Merck, Germany)

ข) แมกนีเซียมออกไซด์ ("Merck" Magnesium oxide, MgO, Lab Grade, E. Merck, Germany)

ค) อะซีโตน ("Baker" Acetone, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

ง) ไฮโฟลซุปเปอร์เซลไดอะตอมมัสเอิร์ท ("Sigma" Hyflo supercel diatomous earth, Lab Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.)

จ) เฮกเซน ("Baker " Hexane AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

ฉ) สารดูดซับ คือ สารผสมไฮโฟลซุปเปอร์เซลไดอะตอมมัสเอิร์ทกับแมกนีเซียม-ออกไซด์ในอัตราส่วน 1 : 1

3.2.10 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ก) สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% เตรียมโดยชั่งเปปโตน ("Merck" Peptone, AR Grade, E. Merck, Germany) มาจำนวน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave "Hariyama" model HA-300MIV, Japan) ที่อุณหภูมิ 121-124 องศา-เซลเซียส นาน 15 นาที

ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด (Becto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, U.S.A.) มาจำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2.11 สารเคมีใช้หาปริมาณยีสต์และรา

ก) สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% เตรียมโดยชั่งเปปโตนมาจำนวน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือ หลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ข) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา (Becto® Potato Dextrose Agar, Difco Laboratory, U.S.A.) มาจำนวน 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ต้องปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 3.5 โดยการเติมสารละลายกรดตาร์ตาริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Tartaric acid, $HOOC(CHOH)_2COOH$, Carlo Erba Reagent, Germany) ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลายกรดตาร์ตาริกความเข้มข้น 10% เตรียมโดยชั่งกรดตาร์ตาริก 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมมะม่วง

นำผลมะม่วงสุกที่มีเปลือกสีเหลืองมากกว่า 80% มาใช้แปรรูปโดยผ่านขั้นตอนการจัดเตรียมและการแช่เยือกแข็งที่บริษัทเชียงใหม่โฟรเซ่นฟูดส์ จำกัด (มหาชน) แสดงดังแผนภูมิรูปที่ 3.1

ผลมะม่วงสุก

↓

ล้างน้ำสะอาด

↓

ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ครั้งที่ 1

(คลอรีนความเข้มข้น 300 ppm)

↓

ล้างน้ำคลอรีนความเข้มข้น 300 ppm ครั้งที่ 2

↓

ล้างน้ำคลอรีนความเข้มข้น 300 ppm ครั้งที่ 3 โดยการฉีดพ่น

(จากด้านบน-ล่างสายพาน)

↓

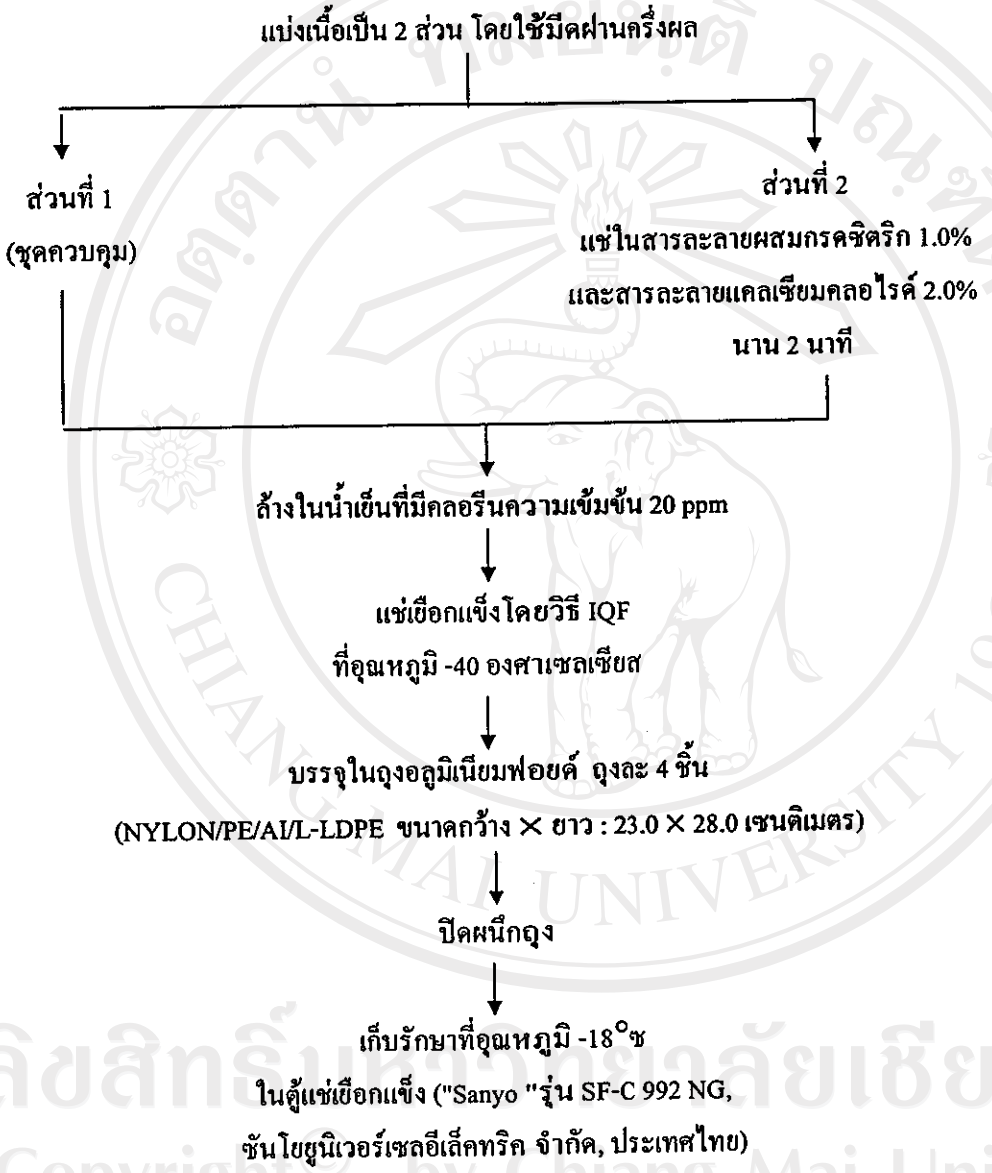
ฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต

↓

ปอกเปลือก

↓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมและการแช่เยือกแข็งมะม่วงพันธุ์มหาชนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 แผนการทดลองออกได้แบ่งเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การศึกษาวิธีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) ในผลมะม่วงหั่นชิ้นพันธุ์มหาชนกก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

นำผลมะม่วงที่สุกทางการค้า คือเปลือกมีสีเหลืองมากกว่า 80% มาปอกเปลือกและฝานเนื้อแบ่งออกเป็น 2 ส่วนต่อผล

- ส่วนที่ 1 นำเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์มหาชนกมาสกัดเอนไซม์ (enzyme extraction) ดัดแปลงจากวิธีของ De Oliveira Lima *et al.* (1999) จากนั้นนำเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้วิธีของ Flurkey and Jen (1978)
- ส่วนที่ 2 นำเนื้อมะม่วงมาแช่ในสารละลายผสมของกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5, 2.0 หรือ 2.5% ตามลำดับ เป็นเวลา 2 นาที และนำไปสกัดเอนไซม์ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหลืออยู่ ตามลำดับ

ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้เนื้อมะม่วง 1 ผล โดยหั่นเนื้อมะม่วงแต่ละผลออกเป็น 2 ส่วน ใช้เป็นชุดควบคุม (ไม่แช่ในสารละลาย) 1 ส่วนและชุดทดลอง (แช่ในสารละลาย) 1 ส่วน เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเนื้อมะม่วงจากส่วนที่ 1 (ชุดควบคุม) และส่วนที่ 2 (ชุดทดลอง) ที่ผ่านการยับยั้งกิจกรรมด้วยสารละลายผสมกรดซิตริกและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Ramdomized Design, CRD) วิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' multiple – range test และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบจับคู่ (Pair-Sample T-test) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V. 10 (อิศรพงษ์, 2544)

วิธีการทดลองนำเนื้อมะม่วงมาแช่ในสารละลายผสมแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5, 2.0 หรือ 2.5% ตามลำดับ (Salunkhe and Desai, 1984; Luna-Guzman and Barrett, 2000; General Chemical Industrial Products, 2004) ที่ละลายในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% (รุจิภรณ์, 2546)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ก) *การเตรียมสารละลายสกัดหยาบ (crude extract)* ทำการสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ De Oliveira Lima *et al.* (1999)

ปั่นเนื้อมะม่วงจนละเอียดด้วยเครื่องปั่น (Blender "Imarflex" model IF-308, Thailand) แล้วชั่งมาจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจัด จากนั้นเติมสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ (extraction solution) คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดเนื้อมะม่วงกับสารละลายสกัดให้เป็นเนื้อเดียว แล้วนำไปแยกสารละลายใสที่ได้โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge Rotina 46R "Hettich Zentrifugen", Germany) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนใสของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ข) *การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส* ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)

ปิเปตสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยกัวอะคอล 0.5% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.1% ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ThermoSpectronic "BioMate 5", U.S.A.) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (specific activity) มีหน่วยเป็นหน่วย/มิลลิกรัมของโปรตีน/นาที วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค) *การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส* ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)

ปิเปตสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองและเติมสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายแคทิคอลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ThermoSpectronic "BioMate 5", U.S.A.) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที นำค่าที่วัดได้ไป เขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีหน่วยเป็น หน่วย/มิลลิกรัมของโปรตีน/นาที วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.

การวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Dye binding

การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin, BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตรจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie brilliant blue (0.05% Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5% เอทานอล และ 10% กรดฟอสฟอริก) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectro 22 "LABOMEB", U.S.A.) นำค่าที่ได้มาเขียนเส้นกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข. 1)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มา 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความ-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไปปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie brilliant blue (0.05% Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5% เอทานอล และ 10% กรดฟอสฟอริก) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน เพื่อนำไปหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายได้ (Bradford, 1976) วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.

ตอนที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ชีวเคมี และเคมีระหว่างการเก็บรักษาเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์มหาชนกแบบแช่เยือกแข็ง

เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 เดือน สุ่มตัวอย่างออกมาทุกเดือน เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี ทางชีวเคมี และการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์เมื่อเริ่มต้นและเดือนที่ 6 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างเนื้อมะม่วงชุดควบคุมกับเนื้อมะม่วงชุดทดลองที่ผ่านกระบวนการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดสก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ T-test (Two-sample T-test) ส่วนอิทธิพลของแต่ละปัจจัยทำการวิเคราะห์ผลแบบ 2*7 factorial in CRD โดยมี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ การใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมีเพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง และปัจจัยที่ 2 คือระยะเวลาการเก็บรักษา วิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ได้ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' multiple – range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V. 10 (อิศรพงษ์, 2544)

วิธีทำ

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก) การวัดสี ทำการวัดสีเนื้อมะม่วงสุกที่ปั่นผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuest II (ColorQuest II Hunterlab, 1997, Hunter Laboratory Inc., U.S.A.)

การใช้เครื่อง ColorQuest II ได้ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาวและสีเทาก่อนใช้เครื่องทุกครั้ง แล้วนำเนื้อมะม่วงที่ปั่นผสมรวมกันมาใส่ดิวเวตและวางไว้ที่ช่องแสงวัด ทำซ้ำ 3 ครั้ง รายงานค่าสีที่วัดได้แสดงเป็นค่า L*, a* และ b*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยค่า L* = the lightness factor (value)

a* และ b* = the chromaticity coordinates (Hue angle, Chroma)

นำค่า a* และ b* ที่ได้มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°) โดยใช้สูตร

$$\text{Chroma};\ C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$$

$$\text{Hue angle};\ H^\circ = (\tan^{-1}(b^*/a^*)/6.2832 \times 360) \quad \text{ถ้า } a^* > 0 \text{ และ } b^* \geq 0$$

เมื่อ L* เป็นค่าความสว่าง ถ้าค่า L* มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีสว่างมากจนเป็นสีขาวหรือสีจาง

a* เป็นค่าแสดงถึงสีแดงและสีเขียว ถ้าค่า a* ที่ค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง หากค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

b* เป็นค่าแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้าค่า b* ที่ค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ถ้าค่า ทั้ง a* และ b* มีค่าเป็นศูนย์แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

C* เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้าค่า C* มีค่าเท่ากับศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา หากมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าวัตถุมีความเข้มสีเพิ่มขึ้น

H° เป็นค่าแสดงถึงสีที่แท้จริงที่ปรากฏให้เห็น คำนวณให้อยู่ในรูปขององศาในวงกลม ซึ่งจะเริ่มต้นตั้งแต่ 0 องศา จนถึง 360 องศา โดยสีในแกนหลัก ได้แก่ 0 องศา สีแดง-ม่วง, 90 องศา สีเหลือง, 180 องศา สีเขียว และ 270 องศา สีน้ำเงิน

(ที่มา : สุคนธ์ชื่นชีและวรรณวิบูลย์, 2543; McGuire, 1992)

การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางชีวเคมี

ก) การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในตัวอย่างเนื้อมะม่วง ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1

การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ก) ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (total titratable acidity) วัดปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อมะม่วงโดยวิธีการไตเตรชัน และคำนวณผลในรูปของกรดซิตริก ตามวิธี AOAC (2000)

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันแต่ละทรีตเมนต์ของแต่ละการทดลองมาตัวอย่างละ 5 กรัม (เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง, Analytical balance, Sartorius analytic : Model A,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Germany) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer (Whatman® model HPMS, England) นำสารละลายตัวอย่างไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.10 นอร์มัล วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ไตเตรทจนเครื่องพีเอชมิเตอร์ (Microprocessor pH meter "HANNA" model 213, U.S.A.) อ่านค่าความเป็นกรด-ด่างได้ 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างมาตรฐานที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดซิตริกต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสดโดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.10 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.007 กรัม

$$\text{\% กรดทั้งหมด (เทียบในรูปกรดซิตริก)} = \frac{\text{ความเข้มข้น [NaOH (N)]} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times 0.070 \times 100}{\text{น้ำหนักของเนื้อมะม่วง (g)}}$$

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.10 นอร์มัลทำการหาความเข้มข้นที่แท้จริงด้วยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate ($C_5H_8KO_4$,)

ข) การวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วลงไป เพื่อเจือจางปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Microprocessor pH meter "HANNA" model 213, U.S.A.) และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้ง ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องวัดโดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 7.0 และ 4.0 (Buffer solution "HANNA", Italy) ตามลำดับ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

ค) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer "ATAGO" model N1, Japan) นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงมาคั้นเอาน้ำออกจากเนื้อแล้ววัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ Hand refractometer ซึ่งวัดค่าได้ระหว่าง 0 - 32% โดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนใช้วัดตัวอย่างน้ำมะม่วงทุกครั้ง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมดใช้วิธีของ Lane and Eynon ที่เรียบเรียงโดย ลักขณาและนิธิยา (2544)

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันมาจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณให้เนื้อมะม่วงกระจายตัว เติม clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 and No. 2 ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ("Whatman" เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร) เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย Fehling No.1 และ No.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์คขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง Hot plate and magnetic stirrer (Hot plate and magnetic stirrer Whatman® model HPMS, England) จนเดือด ไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 หยด ไตเตรทต่อจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Fehling โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทิลีนบลู 1 หยดไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมดเหลือตะกอนสีส้มแดง บันทึกปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก ง.)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์คขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath "Gallenkamp", England) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรต ทำการไตเตรทกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงก่อนการทำอินเวอร์ชัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำตาลซูโครส (%) = $(D_2 - D_1) \times 0.95$

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + D_1

เมื่อ D_1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน

D_2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

จ) ปริมาณแคโรทีนอยด์และแคโรทีนในเนื้อมะม่วง

วิธีการที่ใช้ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000)

การสร้างกราฟมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

1. ชั่งเบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน 0.005 กรัม ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน
3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนได้ 50 มิลลิลิตร
4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 มา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายผสมของอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน
5. นำสารในข้อ 4 ที่ตัวอย่างความเข้มข้นสูงสุดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ThermoSpectronic "BioMate 5", U.S.A.) ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมของอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซนเป็น blank (ภาคผนวก ข. 2)
6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 จากนั้นนำสารละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสมของอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน เป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเบต้า-แคโรทีน (ppm) กับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ แล้วทำสมการเส้นตรงจากกราฟ (ภาคผนวก ข. 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ และแคโรทีน ดัดแปลงจาก AOAC (2000)

การเตรียมคอลัมน์

ใส่สำลีปิดที่ด้านล่างของคอลัมน์ (คอลัมน์แก้วโครมาโตรกราฟีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.2 เซนติเมตร สูง 17.5 เซนติเมตร) ให้สูงขึ้นมา 1 เซนติเมตร เติมสารดูดซับลงในคอลัมน์จนสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วใช้แท่งแก้วกดทับเติมสารดูดซับลงไปและทำการกดทับเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนสารดูดซับสูง 10 เซนติเมตร แล้วเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสให้มีความสูง 1 เซนติเมตร

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงปั่นละเอียด 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หุ้มขวดรูปชมพู่ด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ เติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 40% ในเฮกเซน ลงไป 100 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่อง Magnetic stirrer (Whatman® model HPMS, England) นาน 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ("Whatman" เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร) แยกกากเนื้อมะม่วงกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากเนื้อมะม่วงด้วยอะซีโตน 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และเฮกเซน 25 มิลลิลิตรอีก 1 ครั้ง นำส่วนใสของอะซีโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก ทำการล้างแยกเอาอะซีโตนออกโดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีอะซีโตนผสมอยู่ออกจากส่วนสารเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ("Whatman" 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร) โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรและนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควัน (Hood "Toplab design & technology", England) จนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectro 22 "LABOMEB", U.S.A.) บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (สารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน) ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย และนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วงต่อไป (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.)

หมายเหตุ ใช้กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ห่ออุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้เพื่อป้องกันแสงและทำการทดลองในที่มีแสงน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกสารแคโรทีน

ปีเปตสารละลายผสมที่ได้จากการสกัดแคโรทีนอยด์ในขั้นตอนสุดท้าย 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุสารดูดซับไว้ ให้สารละลายผสมไหลผ่านสารดูดซับจนหมดแล้ว จึงเติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซนลงไป เพื่อชะให้แคโรทีนแยกออกจากสารชนิดอื่นๆ รองรับแคโรทีนที่ออกจากคอลัมน์จนหมด นำสารละลายแคโรทีนที่ได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซนจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้ เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank คือ สารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซน ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย และนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนในเนื้อมะม่วงต่อไป (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข.)

สำหรับคอลัมน์ภายหลังจากแยกแคโรทีนออกมาแล้ว ให้เติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 10% ในเฮกเซนต่อไปจนสารชนิดอื่นๆ ที่ยังไม่ถูกแยกออกในตอนแรกถูกชะออกจากคอลัมน์จนหมด แช่สารในคอลัมน์ด้วยสารผสมอะซีโตน 10% ในเฮกเซน เพื่อใช้ในครั้งต่อไปได้

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

ก) **ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count)** โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

1. เตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่บรรจุในถุง มาวางไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที
2. ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ตัดเปิดปากถุง และใช้ช้อนตัดเนื้อมะม่วงมา 10 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 กรัม นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่น จนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายที่ได้เป็นตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}
3. ปีเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}
4. นำตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 มาเจือจางให้เป็น 1:1000 หรือ 10^{-3} โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ปีเปตตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันวางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง นำไปบ่มในตู้บ่ม (Incubator "Gallenkamp", England) ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามเวลาที่กำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อโดยนับจากจานที่มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับว่ามี Mesophilic aerobic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัมของน้ำหนักสด

หมายเหตุ ปีเปต หลอดทดลองและจานเพาะเชื้อ ต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อน (Hot air oven : UM 100-UM800 "Memmert", Germany) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ข) ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

1. การเตรียมตัวอย่าง

   ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

2. การตรวจปริมาณยีสต์และรา

ปีเปตตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มในตู้บ่ม (Incubator "Gallenkamp", England) ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ± 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามเวลาที่กำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อโดยนับจากจานที่มีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับ ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัมของน้ำหนักสด

หมายเหตุ ปีเปต หลอดทดลองและจานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Hedonic nine point scale (Gatchalian, 1981)

ระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 เดือน ได้สุ่มตัวอย่างออกมาทุกเดือน เพื่อประเมินคุณภาพของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นชุดควบคุม และเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นชุดทดลองที่ผ่านการแช่ในสารละลายผสมกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0% การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส ได้แบ่งลักษณะเฉพาะของเนื้อมะม่วงสุกออกเป็น 6 ลักษณะ ได้แก่ สีที่ปรากฏ (สีเหลือง) ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่นของมะม่วง รสหวาน รสเปรี้ยว และการยอมรับโดยรวม ผู้ทดสอบชิมเป็นนักศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 10 คน และใช้ผู้ทดสอบชิมชุดเดียวกันตลอดการทดลอง การทดสอบแบบ Hedonic nine point scale ให้คะแนนลักษณะของมะม่วงสุกที่ผู้ทดสอบชิมชอบมากที่สุดเท่ากับ 9 แบบประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก จ.

การเตรียมตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างมะม่วงสุกมา 4 ถุง แต่ละถุงมีมะม่วงอยู่ 4 ชิ้น นำชิ้นมะม่วงสุกวางใส่จานและละลายน้ำแข็งโดยใช้เตาไมโครเวฟ ("Sharp " : R351, ชาร์ป แอฟฟลาย แอนซ์ จำกัด, ประเทศไทย) เป็นเวลา 3 นาที แล้วหั่นเนื้อมะม่วงส่วนปลายออกทั้ง 2 ด้านออกเล็กน้อย หลังจากนั้นหั่นชิ้นมะม่วงตามขวางของผลออกเป็น 3 ชิ้น แล้ววางใส่จานสีขาว ให้ผู้ทดสอบชิม คนละ 2 ชิ้นต่อ 1 ชุดการทดลอง โดยผู้ทดสอบชิมทุกคนจะชิมเนื้อมะม่วงสุก 2 ชุดการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

สุ่มตัวอย่างเนื้อมะม่วงถูกนำเสนอให้ผู้ทดสอบชิมเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างเนื้อมะม่วงชุดควบคุมกับเนื้อมะม่วงชุดทดลอง โดยวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ T-test (Two-sample T-test) ส่วนอิทธิพลของแต่ละปัจจัยทำการวิเคราะห์ผลแบบ 2*7 factorial in RCBD โดยมี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ การใช้สารเคมีและไม่ใช้สารเคมีเพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง และปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาการเก็บรักษา โดยสุ่มตัวอย่างทุกๆ เดือนตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงเดือนที่ 6 วิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved