บทที่ 3
วัตถุดิบ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก (*Mangifera indica* Linn. cv. Maha-Chanok) และผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (*Litchi Chinensis* Sonn. cv. Hong Huay) ที่ใช้ศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นต้น ซื้อมาจากตลาดต้นพะยอม อ. เมือง จ. เชียงใหม่ ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2551 สำหรับผลมะม่วงและผลลิ้นจี่ที่นำไปแปรรูปแช่เยือกแข็งในโรงงาน ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณประดลเดช กัลยาณมิตร สวนผลไม้ที่ ต. ท่าตอน อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่ ซึ่งเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 เป็นผลมะม่วงที่มีระยะสุกทางการค้า เปลือกมีสีเหลืองมากกว่า 80% น้ำหนักผลอยู่ในช่วง 350-400 กรัม และผลลิ้นจี่ที่มีระยะสุกทางการค้า เปลือกมีสีแดง คัดเลือกผลให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่ถูกทำลายจากโรคและแมลง ผลลิ้นจี่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 20-25 กรัม

การขนส่งผลมะม่วงและผลลิ้นจี่ ทำโดยบรรจุผลมะม่วงในกล่องกระดาษกล่องละ 15 ผล จำนวน 5 กล่อง และบรรจุผลลิ้นจี่ในกล่องกระดาษกล่องละ 10 กิโลกรัม จำนวน 4 กล่อง แล้วขนส่งมายังห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้เวลาไม่เกิน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำผลไม้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและนำไปแปรรูปในวันรุ่งขึ้น

3.2 เครื่องมือ

- เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Model C831, Consort, Turnhout, Belgium)
- เครื่องไทเทรตกรดอัตโนมัติ (Automatic Titrator, Model 230, TitroLine easy, SCHOTT, Belgium)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer, Model PR-101, Atago, Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan, 0-45%)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์, SPECORD 40, Analytik Jena, Germany)
- เครื่องวัดสี (Colorimeter, ColorQuestXE, HunterLab, Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA)
- เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer, TA-XT2i/50, Stable Micro Systems, Ltd., Godalming, UK)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, MIKRO 22R, Hettich, Minnesota, USA**)**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance, PB1502-S, Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance, AB204-S,Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate stirrer, HTS-1003, LMS, Tokyu, Japan)
- หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave, Hirayama : HA-300MIV, Japan)
- ตู้บ่ม (Incubator for Bacteria Culture, GmbH, Memmert, Schwalbach, Germany)
- ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer, Sharp, model FR-148E, Thailand)
- ตู้ดูดควัน (Hood, Top lab Design and Technology, England)
- อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Heat circulate water bath, YCW-010, Taipei,China)
- เครื่องตีป่น (Stomacher, Seward Chemical : 400, Barcelona, Spain)
- เครื่องปั่น (Blender, AAW9, Moulinex, Indonesia)
- เครื่องปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 50-200 ไมโครลิตร (Auto pipette, Gilson,)
- เครื่องปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร (Auto pipette, Wiggen Hauser, Berlin Germany)
- กล้องจุลทรรศน์สเตริโอ (Stereo Microscope, model SZ61, Oympus, Hamburg, Germany)
- กรวยแยก (Separating funnel, 250 ml, China)
- ควอซคิวเวตต์ (cuvette of quartz)
- กระดาษกรอง เบอร์ 1, 2 และ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Filter paper, Whatman, England)
- ถุงพอลิเอทิลีน (Polyethylene, PE) ขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 10 x 12 นิ้ว สำหรับบรรจุเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็ง และขนาด 9 x 12 นิ้ว สำหรับบรรจุเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็ง จากร้านเชียงใหม่พลาสติก
- ถุงร้อน (Polypropylene, PP.) ขนาดกว้าง เท่ากับ 8 x 12 นิ้ว จากบริษัทยูนิคอุตสาหกรรมพลาสติก จำกัด จ.สมุทรปราการ ใช้สำหรับเจือจางตัวอย่างเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์
- ขวดพลาสติกขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้สำหรับยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และเตรียมเนื้อมะม่วงสุกก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

ก. สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก (Citric acid, Food Grade, O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiang Mai, Thailand) จำนวน 5, 10 และ 15 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ข. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% เตรียมโดยชั่งแคลเซียม-คลอไรด์ (Calcium chloride-2-hydrate, Food Grade, O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiang Mai, Thailand) จำนวน 5, 10 และ 15 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ค. สารละลายผสมระหว่างกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0% เตรียมโดยชั่งกรดซิตริกจำนวน 10 หรือ 100 กรัม และชั่งแคลเซียมคลอไรด์จำนวน 10 หรือ 100 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรหรือ 10 ลิตร ตามลำดับ

ง. สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid (PA), Thai Peroxide Co., Ltd, Thailand) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยนำสารละลายกรดเพอร์ออกซี-แอซีติกความเข้มข้น 5% (w/v) มา 40 มิลลิลิตรผสมในน้ำกลั่น 20 ลิตร

สารเคมีที่ใช้สำหรับยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และเตรียมเนื้อลิ้นจี่ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

ก. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% เตรียมโดยชั่งแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride-2-hydrate, O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiang Mai, Thailand) จำนวน 5, 10 และ 15 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ข. สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid (PA), Thai Peroxide Co., Ltd, Thailand) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยนำสารละลายกรดเพอร์ออกซี-แอซีติกความเข้มข้น 5% (w/v) มา 40 มิลลิลิตรผสมในน้ำกลั่น 20 ลิตร

ค. สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก (peroxyacetic acid (PA), Thai Peroxide Co., Ltd, Thailand) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยนำสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกความเข้มข้น 5% (w/v) มา 20 มิลลิลิตรผสมในน้ำกลั่น 20 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ก. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งเป็นสารละลายชนิดเดียวกับที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์

ข. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

- Stock solution ความเข้มข้น 1% (w/v): เตรียมโดยชั่งโปรตีนอัลบูมินมาตรฐาน (Bovine serum albumin, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร
- Working solution ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร: เตรียมโดยปิเปตต์สารละลาย Stock solution ความเข้มข้น 1% (w/v) มาจำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยสารละลายข้อ ก.

ค. สารละลายสีย้อม: เตรียมโดยชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% (Ethanol 95%, Food Grade, O.V. Chemical & Supply Ltd., Chiang Mai, Thailand) จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (*ortho*-Phosphoric acid, E. Merck, Germany) จำนวน 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

ก. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, E. Merck, Germany) (NaCl, MW = 58.50) จำนวน 11.70 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

ข. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Disodium hydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($Na_2HPO_4.2H_2O$, MW = 177.99) จำนวน 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($NaH_2PO_4.2H_2O$, MW = 156.01) จำนวน 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2: เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ค. จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายจากข้อ ข. พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2

จ. สารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์: เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ง. จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจากข้อ ก. จำนวน 25 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

ก. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Disodium hydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($Na_2HPO_4.2H_2O$, MW = 177.99) จำนวน 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($NaH_2PO_4.2H_2O$, MW = 156.01) จำนวน 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5: เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ (ข) จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

ง. สารละลายแคทีคอลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งไพโรแคทีคอล (Pyrocatechol, AR Grade, E. Merck, Switzerland) ($C_6H_6O_2$, MW = 110.11) จำนวน 2.7527 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้ จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

ก. สารละลายโซเดียมแอซีเทตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งโซเดียมแอซีเทต-แอนไฮดรัส (Sodium acetate, AR Grade, E. Merck, Germany) (CH_3COONa, MW = 82.03) จำนวน 0.8203 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. กรดแอซีติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์: เตรียมโดยปิเปตต์กรดแอซีติก (Glacial acetic acid, AR Grade, E. Merck, Germany) (CH_3COOH, MW = 60.05, Specific gravity = 1.0491) จำนวน 0.57 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค. สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0: เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ (ก.) จำนวน 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายจากข้อ (ข.) พร้อมคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0

ง. สารละลายกัวอะคอลความเข้มข้น 1% (w/v): เตรียมโดยชั่งกัวอะคอล (Guaiacol, AR Grade, Fluka, Japan) ($C_7H_8O_2$, MW = 124.14) จำนวน 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ. สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% (w/v): เตรียมโดยชั่งสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% (Hydrogen peroxide 30%, AR Grade, Carlo Erba, Germany) จำนวน 3.33 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ฉ. สารละลายสับสเตรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส คือ สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 (ซึ่งประกอบด้วยกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1%): เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ค. จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจากข้อ ง. จำนวน 50 มิลลิลิตร และสารละลายจากข้อ จ. จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

สารละลายในข้อ ง. จ. และ ฉ. ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, E.Merck, Germany) (NaOH, MW = 40.00) จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นมาตรฐาน (standardization) โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, Fluka, Switzerland) ($C_5H_8KO_4$) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง

ก. น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร: เตรียมโดยชั่งน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ จำนวน 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

ข. สารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตความเข้มข้น 60%: เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, AR Grade, E.Merck, Germany) ($C_4H_4KNaO_6 4H_2O$, MW = 282.23) มาจำนวน 30 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

ค. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์: เตรียมโดยชั่งโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, E.Merck, Germany) (NaOH, MW= 40.00) จำนวน 8 กรัมละลายในน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร

ง. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) ความเข้มข้น 1% (w/v): เตรียมโดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (3,5 dinitrosalicylic acid, Fluka, China) ($C_7H_4N_2O_7$, MW = 228.19) 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 20 มิลลิลิตรและสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตความเข้มข้น 60% จำนวน 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมมาคนจนละลายหมดแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บในขวดสีชา

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ก. สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% (v/v): เตรียมโดยตวงเอทานอลความเข้มข้น 95% จำนวน 210.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร

ข. Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% (v/v): เตรียมโดยปิเปตต์ Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu reagent, Fluka, Switzerland) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

ค. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (w/v): เตรียมโดยชั่งโซเดียม-คาร์บอเนตแอนไฮดรัส (Sodium carbonate anhydrous, Carlo Erba, Germany) จำนวน 7.5 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ง. สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร: เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก (Gallic acid, AR Grade, E. Merck, Spain) ($C_7H_6O_5$, MW = 170.12) จำนวน 0.01 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วงสุก

ก. เบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน (Standard β-carotene, Fluka, Switzerland)

ข. คลอโรฟอร์ม (Chloroform, AR grade, E. Merck, Germany) ($CHCl_3$)

ค. แอซีโตน (Acetone, AR grade, E. Merck, Germany) (CH_3COCH_3, MW. = 58.08 g/mol)

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

จ. สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน: เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ฉ. สารละลายผสมของแอซีโตน 40% ในเฮกเซน: เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจำนวน 400 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar: เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Plate count agar, E. Merck, Germany) จำนวน 22.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำอาหารใส่ขวดดูแรนไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

- เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตความเข้มข้น 0.1% (w/v) (Disodium hydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($Na_2HPO_4.2H_2O$, MW = 177.99) โดยชั่งสารมาจำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
- เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตเข้มข้น 0.1% (w/v) (Sodium dihydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($NaH_2PO_4.2H_2O$, MW = 156.01) โดยชั่งสารมาจำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ความเข้มข้น 0.1%: เตรียมโดยค่อยๆ เติมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตความเข้มข้น 0.1% (w/v) ลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรตความเข้มข้น 0.1% (w/v) จน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องพีเอชอ่านค่าได้เท่ากับ 7.2 จากนั้น ปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลอง 9.0 มิลลิลิตรต่อหลอด สำหรับใช้ในการเจือจางตัวอย่าง และตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 90 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างสารละลายตัวอย่างเจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4 วิธีการทดลอง

งานวิจัยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1. ศึกษาระดับความเข้มข้นสารละลายกรดซิตริกและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (POD) ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นพันธุ์มหาชนกก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

ตอนที่ 2. ศึกษาระดับความเข้มข้นสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส และเนื้อสัมผัสของเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

ตอนที่ 3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี ทางชีวเคมี และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นพันธุ์มหาชนกและเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย เมื่อเริ่มต้นเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง

ตอนที่ 1. ศึกษาระดับความเข้มข้นสารละลายกรดซิตริกและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (POD) ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นพันธุ์มหาชนกก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1

ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกหรือสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นครึ่งผลพันธุ์มหาชนก ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกหรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5%

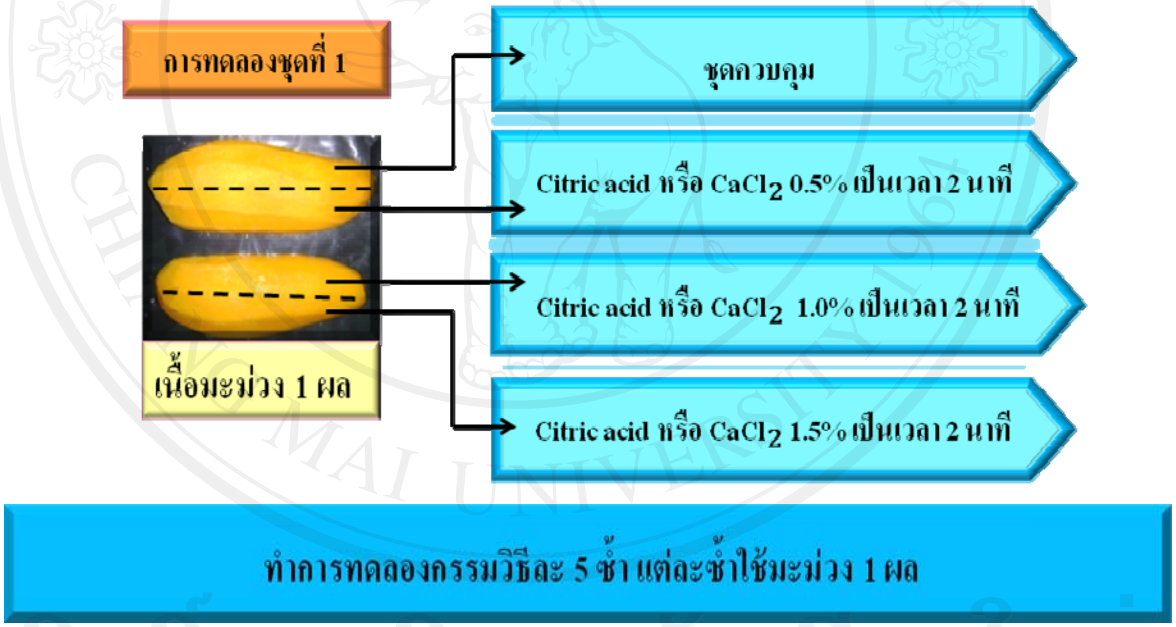
กรรมวิธีที่ 3 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกหรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0%

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกหรือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในแต่ละกรรมวิธีเป็นเวลา 2 นาที กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้มะม่วง 1 ผล โดยแต่ละผลแบ่งออกเป็น 4 ส่วนตามแนวยาวของผล (4 กรรมวิธี) ใช้เป็นชุดควบคุม (ไม่จุ่มในสารละลาย) 1 ส่วน และอีก 3 ส่วน เป็นชุดทดลอง ซึ่งจุ่มในสารละลายกรดซิตริกหรือสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังในรูปที่ 3.1 และรูปที่ 3.2 แล้ววัดการลดลงกิจกรรมของเอนไซม์ของเนื้อมะม่วง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ T-test (Two-sample T-test) โดยวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างเนื้อมะม่วงหั่นชิ้นที่จุ่มในสารละลายกรดซิตริกหรือสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2

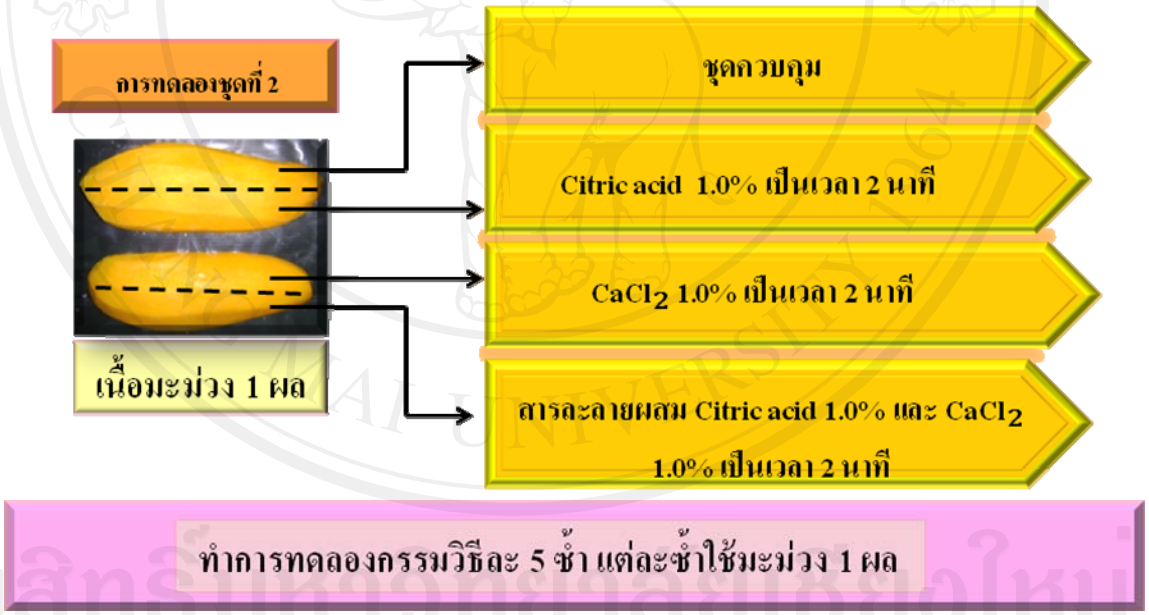
ศึกษาผลของสารละลายผสมระหว่างกรดซิตริกและแคลเซียมคลอไรด์ ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นครึ่งผลพันธุ์มหาชนก ภายหลังการเลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ให้ผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุด จากการทดลองที่ 1 ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0%

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0%

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงในสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0% และกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0%



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างเนื้อมะม่วงหั่นชิ้นที่จุ่มในสารละลายกรดซิตริกหรือแคลเซียมคลอไรด์และสารละลายผสมที่ระดับความเข้มข้น 1.0%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2. ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส และปรับปรุงความแน่นเนื้อของเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

ประกอบด้วย 4 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม

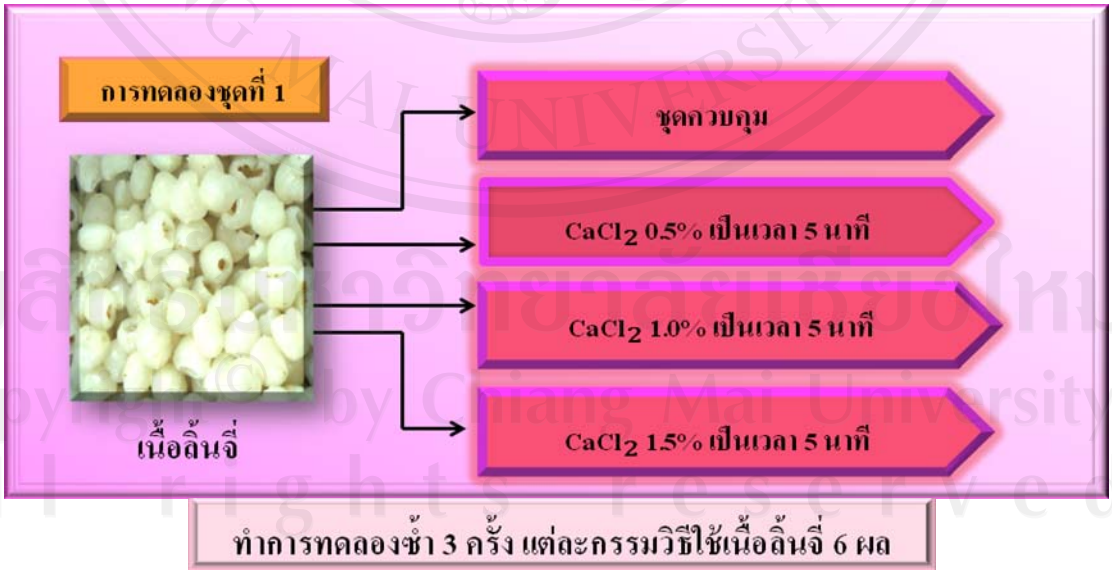
กรรมวิธีที่ 2 จุ่มเนื้อลิ้นจี่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5%

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มเนื้อลิ้นจี่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0%

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มเนื้อลิ้นจี่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5%

นำผลลิ้นจี่มาคว้านเมล็ดและแกะเอาเปลือกออก แบ่งเนื้อลิ้นจี่เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ผล แล้วจุ่มเนื้อลิ้นจี่แต่ละกลุ่มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงดังในรูปที่ 3.3 แล้วนำมาวัดความแน่นเนื้อและผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ของเนื้อลิ้นจี่โดยคำนวณเป็นเพอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับเนื้อลิ้นจี่ชุดควบคุม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ T-test (Two-samples T-test) โดยวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16



รูปที่ 3.3 ตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ที่จุ่มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

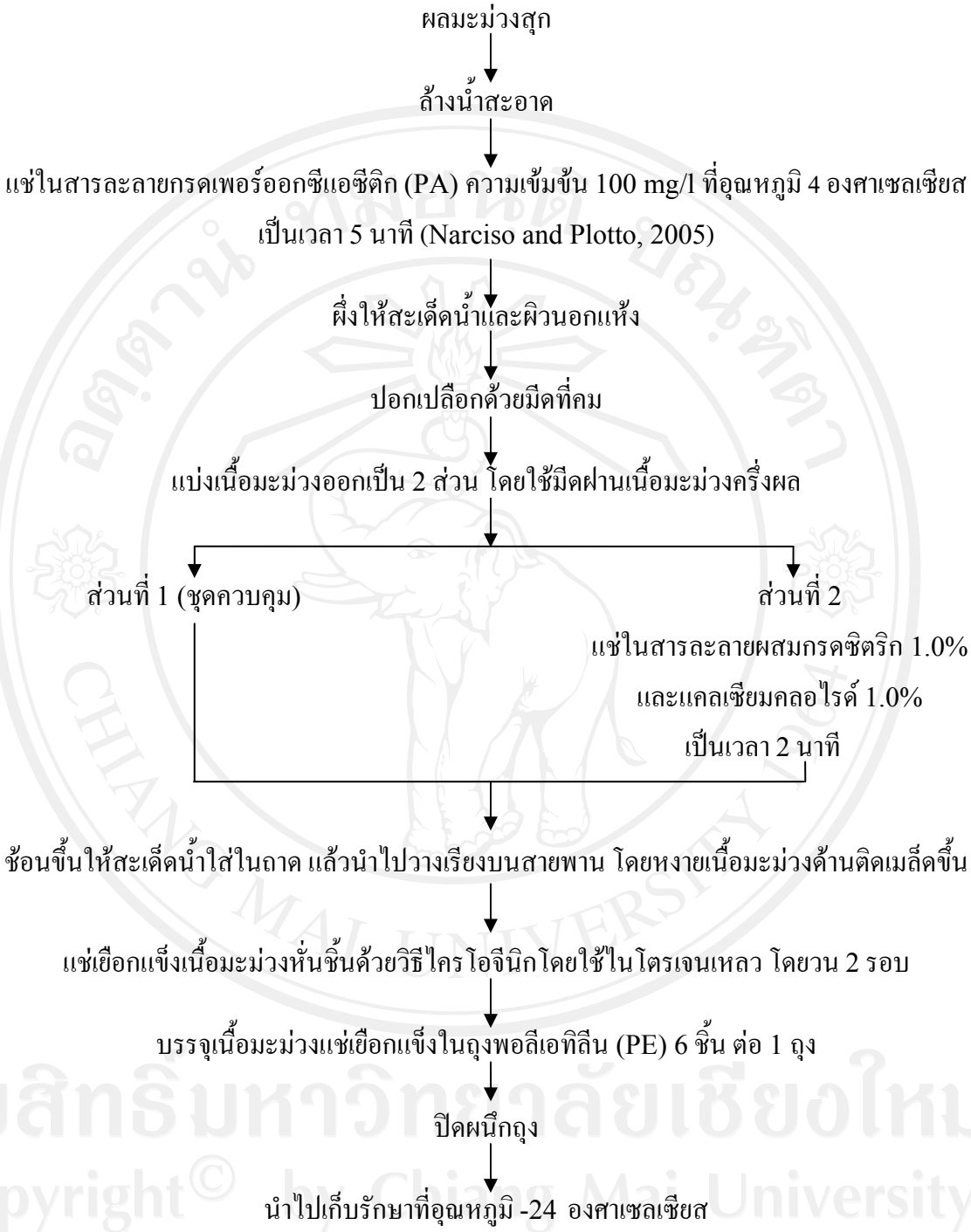
ตอนที่ 3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี ทางชีวเคมี และวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นพันธุ์มหาชนกและเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย เมื่อเริ่มต้นเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง

วัตถุดิบ

ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกและผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยที่ได้มาจากสวนคุณประดลเดช กัลยาณมิตร ต.ท่าตอน อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่ โดยเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 เป็นผลมะม่วงที่มีระยะสุกทางการค้า โดยมีเปลือกมีสีเหลืองมากกว่า 80% และมีน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 350-400 กรัม สำหรับผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยเป็นผลที่มีระยะสุกทางการค้าเปลือกมีสีแดง คัดเลือกผลให้มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยน้ำหนักอยู่ในช่วง 20-25 กรัม นำผลมะม่วงและลิ้นจี่มาแปรรูป แล้วนำไปแช่เยือกแข็งแบบไครโอจีนิกโดยใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส ที่บริษัทลีโอฟูดส์ จำกัด เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม 2551 แล้วบรรจุเนื้อผลไม้ที่แช่เยือกแข็งแล้วในถุงพอลิเอทิลีน ขนาดกว้าง×ยาว : 10×12 นิ้ว สำหรับเนื้อมะม่วง และ 9×12 นิ้ว สำหรับเนื้อลิ้นจี่

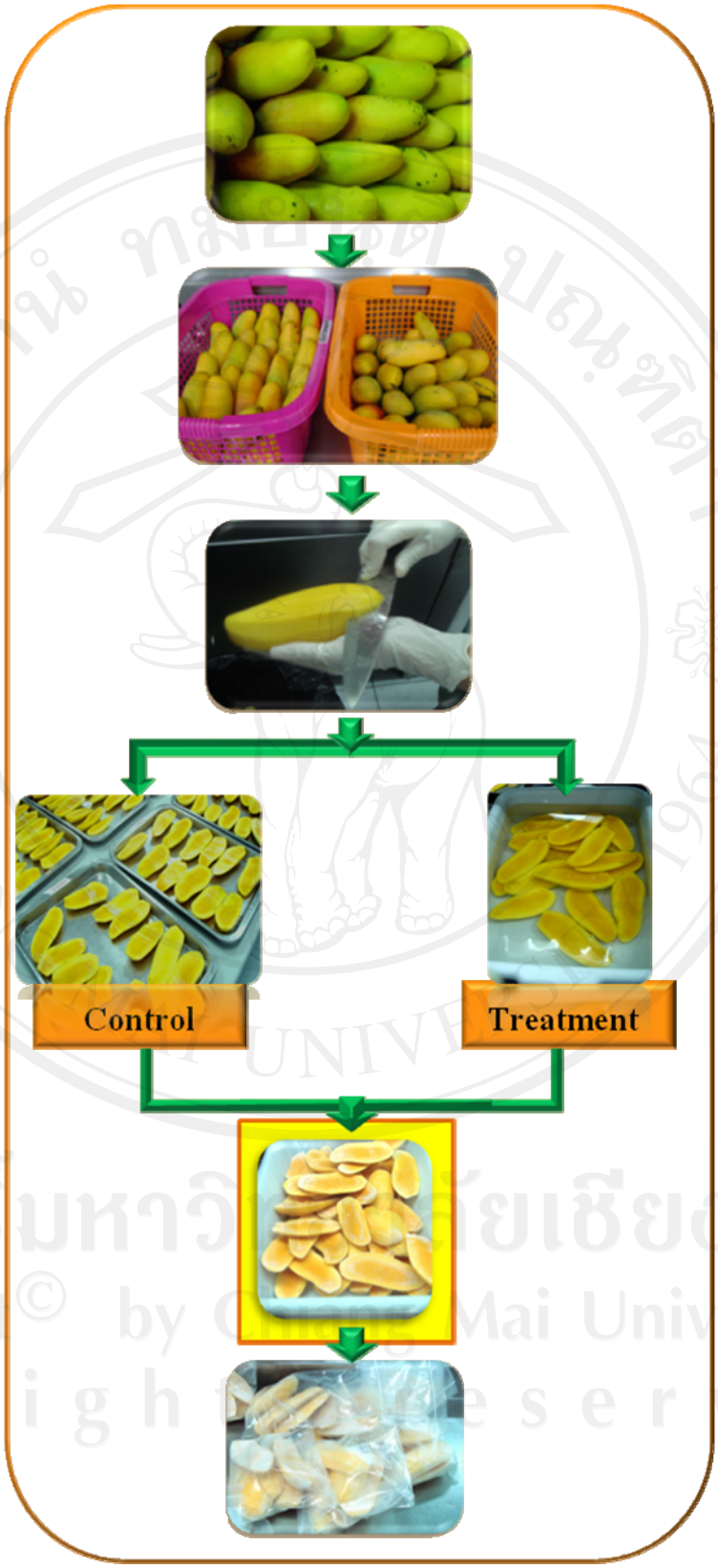
ขั้นตอนการจัดเตรียมและการแช่เยือกแข็งเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3.1 รูปที่ 3.4 และแผนภูมิที่ 3.2 รูปที่ 3.5 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



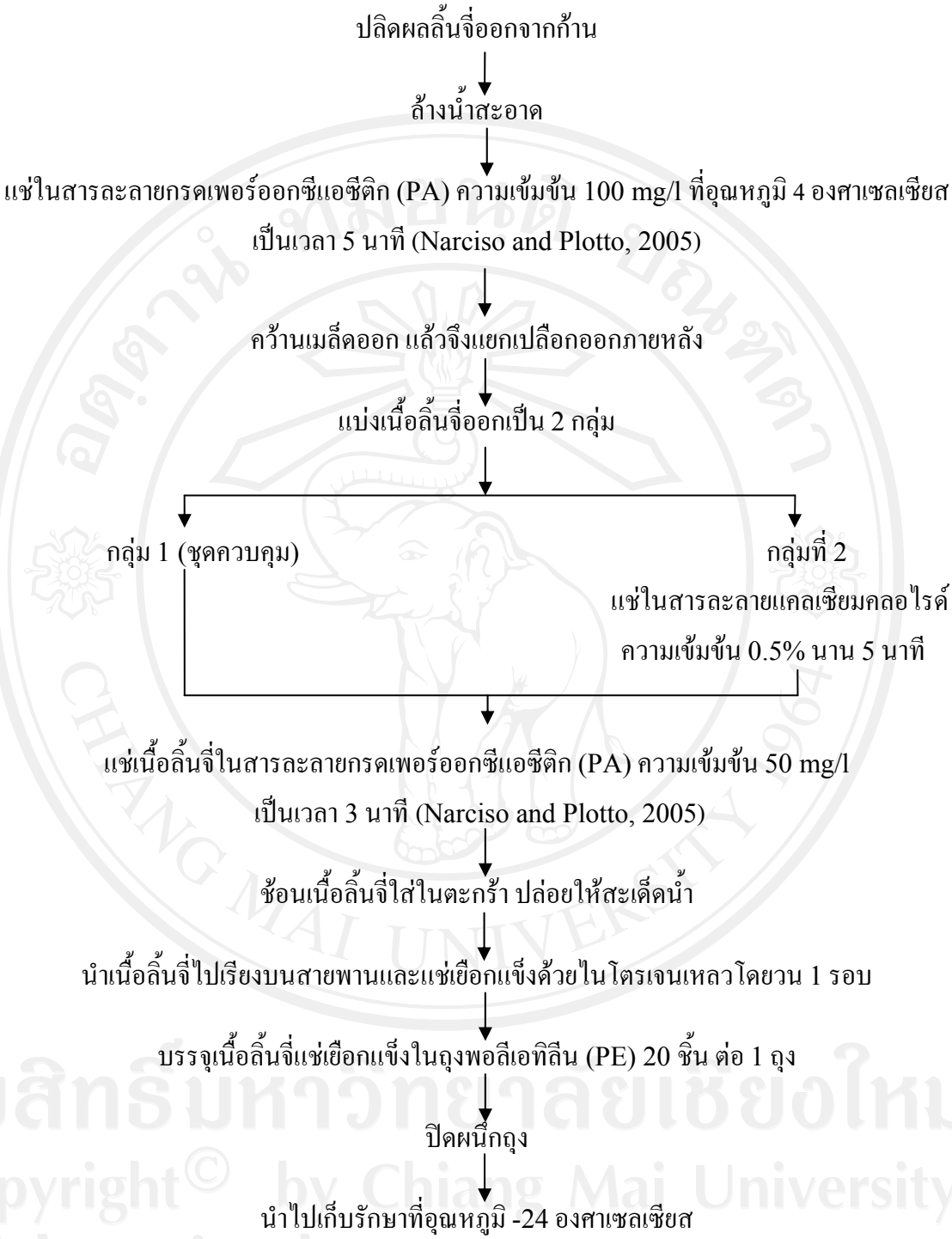
แผนภูมิที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมและการแช่เยือกแข็งเนื้อมะม่วงพันธุ์มหาชนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



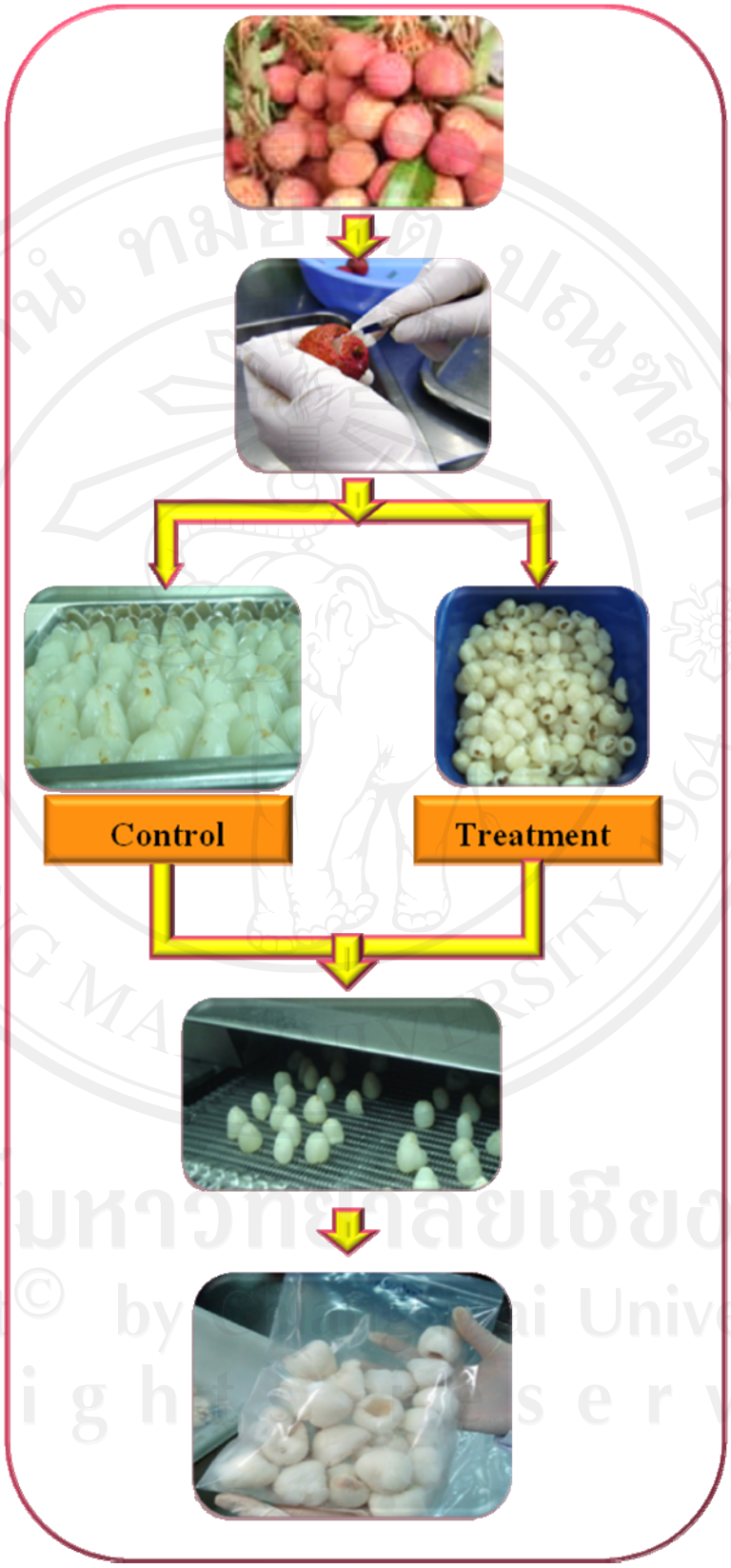
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการเตรียมและการแช่เยือกแข็งเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์มหาชนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



แผนภูมิที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมและการแช่เยือกแข็งเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการเตรียมและการแช่เยือกแข็งเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำผลไม้แช่เยือกแข็งที่บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนมาบรรจุในกล่องกระดาษแข็ง (ขนาดกว้าง×ยาว×สูง : 39.5×40.5×26.5 เซนติเมตร) ของบริษัทลีโอฟูดส์ จำกัด อีก 1 ชั้น แล้วเก็บรักษาไว้ที่ห้องแช่เยือกแข็งของโรงงาน 1 วันก่อนขนย้ายมายังสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งวิธีการขนย้ายเนื้อผลไม้แช่เยือกแข็งจากโรงงานลีโอฟูดส์ จำกัด ทำโดยการบรรจุน้ำแข็งแห้งในกล่องโฟม (ขนาดกว้าง×ยาว×สูง : 35×47×37 เซนติเมตร) จำนวน 4 ก้อนต่อ 1 กล่อง ก่อนนำผลไม้แช่เยือกแข็งบรรจุลงในกล่องโฟม หลังจากนั้นขนย้ายเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่บรรจุในกล่องโฟมจำนวน 1 กล่องและเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งอีกจำนวน 1 กล่อง ด้วยรถยนต์ปรับอากาศมายังสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง นำมาเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส (“Sharp” model FR-148E, ประเทศไทย) เป็นเวลา 6 เดือน สุ่มตัวอย่างเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งออกมาทุกเดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส และวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี ปริมาณแคโรทีนอยด์ (เฉพาะเนื้อมะม่วง) และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสำหรับการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ทำการทดลองเฉพาะตัวอย่างเมื่อเก็บรักษาครบ 6 เดือน

การวิเคราะห์คุณภาพของเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่

การเตรียมตัวอย่าง

เนื้อมะม่วง

วิเคราะห์คุณภาพของเนื้อมะม่วงเมื่อเริ่มต้นและระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง โดยสุ่มตัวอย่างชุดควบคุมและชุดทดลองออกมาทุกเดือนๆ อย่างละ 1 ถุง มีจำนวน 6 ชิ้น แบ่งวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทันทีที่เปิดถุง แบ่งชิ้นเนื้อมะม่วงสำหรับใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี 3 ชิ้น ซึ่งปั่นรวมเป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่หลอมละลาย และอีก 3 ชิ้น นำไปหลอมละลายเพื่อนำไปวัดสีและค่าความแน่นเนื้อ ขั้นตอนการหลอมละลายเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็ง ทำโดยนำชิ้นเนื้อมะม่วงสุกแช่เยือกแข็งที่เหลืออยู่อีก 3 ชิ้น ในถุงพอลิเอทิลีนมาแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

เนื้อลิ้นจี่

สำหรับเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งสุ่มตัวอย่างชุดควบคุมและชุดทดลองออกมาทุกเดือนๆ ละ 1 ถุง มีจำนวน 20 ผล แบ่งวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทันทีที่เปิดถุง แบ่งชิ้นเนื้อลิ้นจี่สำหรับใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี 10 ผล ซึ่งปั่นรวมเป็นเนื้อเดียวกันโดยไม่หลอมละลาย และเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งอีก 10 ผล นำไปหลอมละลายเพื่อนำไปวัดค่าความแน่นเนื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยแช่เนื้อลิ้นจี่ที่อยู่ในถุงพอลิเอทิลีนในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก. การวัดสีของเนื้อมะม่วง

ทำการวัดสีเนื้อมะม่วงด้านที่ติดเปลือกตามระบบ CIE เป็นค่า L*, a* และ b* โดยวัดสีเนื้อมะม่วง 3 ชิ้น ชิ้นละ 3 จุด รวม 9 ซ้ำ ด้วยเครื่องวัดสี ColorQuestXE และก่อนใช้เครื่องวัดสีทุกครั้งปรับมาตรฐานด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐาน (light trap และ white trap) แล้วรายงานค่าสีที่วัดได้เป็นค่า L*, C* และ H^o โดย

L* = The lightness factor values

ถ้าค่า L* เท่ากับ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีขาว และถ้าค่า L* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

a* = เป็นค่าแสดงสีแดงและสีเขียวของวัตถุ

ถ้าค่า a* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีเขียว

b* = เป็นค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงินของวัตถุ

ถ้าค่า b* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง ถ้าค่า b* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน

ถ้าค่า ทั้ง a* และ b* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

C* = เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้าค่า C* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา หากมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าวัตถุมีความเข้มของสีมากขึ้น โดยค่า C* คำนวณได้จาก

Chroma; $(C^*) = SQRT (a^2 + b^2)$

H^o = เป็นค่าแสดงสีที่ปรากฏให้เห็น ค่าที่คำนวณได้เป็นองศาในวงกลม ซึ่งมีค่าเริ่มต้นตั้งแต่ 0^o จนถึง 360^o ซึ่งค่า H^o นี้จะชี้บ่งถึงสีที่แท้จริงที่ปรากฏให้เห็น โดยสีในแถบแกนหลัก ได้แก่ 0^o และ 360^o สีแดง, 90^o สีเหลือง, 180^o สีเขียว และ 270^o สีน้ำเงิน

โดยค่า H^o คำนวณได้จาก ค่า a* และ b* ดังสมการ

Hue angle; $(H^o) = (\tan^{-1} (b^*/a^*)/6.2832 \times 360)$
(McGuire, 1992)

ข. การวัดลักษณะเนื้อสัมผัส

วัดค่าความแน่นเนื้อของเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ ด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA-XT2i/50, Stable Micro Systems)

เนื้อมะม่วง: นำเนื้อมะม่วงมาวัดค่าแรงกดทั้ง 2 ด้าน คือ เนื้อด้านติดเปลือกและด้านติดเมล็ด ด้านละ 3 จุด รวมทั้งหมด 6 จุดต่อ 1 ชิ้น ใช้เนื้อมะม่วงทั้งหมด 3 ชิ้น โดยใช้ probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (6 mm-diameter probe) ที่ระดับความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและบันทึกค่าแรงกดที่วัดได้ในหน่วยนิวตัน (Narciso and Plotto, 2005)

เนื้อลิ้นจี่: นำเนื้อลิ้นจี่ 10 ผลมาผ่าครึ่งผลได้ทั้งหมด 20 ชิ้น แล้ววัดค่าแรงกด ชิ้นละ 1 ครั้ง โดยใช้ probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (2 mm-diameter probe) ที่ระดับความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที แล้วนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและบันทึกค่าแรงกดที่วัดได้ในหน่วยนิวตัน (Shah and Nath, 2008)

การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

การเตรียมเนื้อมะม่วง: ปั่นเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็ง 3 ชิ้นรวมกันด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 15 วินาที หลังจากนั้นนำเนื้อมะม่วงที่ปั่นละเอียดแล้วบรรจุในขวดพลาสติกที่แช่เย็นจำนวน 3 ขวด แต่ละขวดทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทันทีภายหลังการปั่นชิ้นเนื้อมะม่วง และชุดที่สองใช้สำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี โดยเก็บรักษาเนื้อมะม่วงที่ปั่นแล้วใส่ในขวดพลาสติกบรรจุในถุงพอลิเอทิลีนอีกชั้น และเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

การเตรียมเนื้อลิ้นจี่: ปั่นเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็งจำนวน 10 ผลรวมกันด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นละเอียดแล้วบรรจุในขวดพลาสติกที่แช่เย็น จำนวน 3 ขวด แต่ละขวดทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยทำเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทันทีภายหลังการปั่นเนื้อลิ้นจี่ และชุดที่สองใช้สำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี โดยเก็บรักษาเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นแล้วใส่ในขวดพลาสติกบรรจุในถุงพอลิเอทิลีนอีกชั้น จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

ก. ค่าพีเอช

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นละเอียดแล้วมาจำนวน 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วลงไป 50 มิลลิลิตร วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช โดยก่อนใช้เครื่องวัดพีเอชทุกครั้ง ปรับเทียบมาตรฐานของเครื่องวัดพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 10.1, 7.1 และ 4.1 ตามลำดับ

ข. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (total titrable acidity)

วัดปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในตัวอย่างเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่โดยวิธีการไทเทรชันด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริกสำหรับเนื้อมะม่วงและในรูปของกรดกรดมาลิกสำหรับเนื้อลิ้นจี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นด้วยเครื่องปั่น จำนวน 5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากัน โดยใส่แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ในบีกเกอร์แล้วนำไปวางบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า นำสารละลายตัวอย่างดังกล่าวไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ไทเทรตจนถึงจุดยุติเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 8.1 จึงบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริกต่อกรัมของเนื้อมะม่วงและในรูปของกรดมาลิกต่อกรัมของเนื้อลิ้นจี่ โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ดังนี้

1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.07 กรัม (Rangana, 1986)

$$\text{ปริมาณเกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH(N) x ปริมาตร NaOH (ml) x 0.07 x 100}}{\text{น้ำหนักเนื้อมะม่วง (g)}}$$

(ในรูปกรดซิตริก)

1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดมาลิก 0.067 กรัม (Rangana, 1986)

$$\text{ปริมาณเกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH(N) x ปริมาตร NaOH (ml) x 0.067 x 100}}{\text{น้ำหนักเนื้อลิ้นจี่ (g)}}$$

(ในรูปกรดมาลิก)

ค. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids)

วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยนำน้ำคั้นของเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่มาหยดลงบนเครื่อง Digital refractometer ทำการวัด 3 ครั้งและแสดงค่าที่ได้เป็นหน่วยเพอร์เซ็นต์

ง. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงโดยใช้วิธีของ Miller (1959)

วิธีนี้เป็นการวัดปริมาณของหมู่คาร์บอนิล (C=O) หรือน้ำตาลรีดิวซิงที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลที่มีหมู่แอลดีไฮด์หรือหมู่คีโทนเป็น functional group เช่น น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโทส โดยน้ำตาลรีดิวซิงจะทำปฏิกิริยากับ dinitrosalicylic acid (DNS reagent) และน้ำตาลรีดิวซิงต่างชนิดกันจะให้ผลความเข้มสีของ dinitrosalicylic acid ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงวิเคราะห์ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งได้จากการเติมสารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS reagent) ที่จะถูกรีดิวซ์ในสภาวะที่เป็นด่าง ภายหลังการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 20 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตความเข้มข้น 60% เพื่อลดปริมาณการละลายของแก๊สออกซิเจนในสารละลายและทำให้สีของสารละลายมีความคงตัว ปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่แอลดีไฮด์ในโมเลกุลของน้ำตาลทำให้ได้หมู่คาร์บอกซิล และเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ 3, 5-dinitrosalicylic acid ต่อเนื่องในสารละลายด่าง ได้เป็น 3-amino,5-nitrosalicylic acid ดังสมการ

$$\text{aldehyde group} \xrightarrow{\text{oxidation}} \text{carboxyl group}$$

$$\text{3,5-dinitrosalicylic acid} \xrightarrow{\text{reduction}} \text{3-amino,5-nitrosalicylic acid}$$

การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยปิเปตต์มาจากสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ใส่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 2 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนั้นนำข้อมูลระหว่างค่าเข้มข้นของน้ำตาลกับค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ตัวอย่างเส้นกราฟมาตรฐานอยู่ในภาคผนวก ก รูปภาคผนวก ก. 1

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นละเอียดมา 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณหาปริมาณน้ำตาล โดยปิเปตต์สารลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2.9 มิลลิลิตร และเติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจุ่มในน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เย็นทันที แล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ แล้วคำนวณหน่วยเป็นกรัม/100 กรัมของเนื้อผลไม้ แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก.1

จ. สารประกอบฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ใช้วิธีของ Singleton and Rossi (1965) และ Ketsa and Atantee (1998)

การสร้างกราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตัวอย่างเส้นกราฟมาตรฐานอยู่ในภาคผนวก ก รูปภาคผนวก ก. 2

การสกัดสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ชั่งเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ที่บดละเอียดจำนวน 3 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นแล้ว เติมเอทานอลความเข้มข้น 80% ที่เย็นจัดลงไปจำนวน 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันดีโดยใช้เวลาประมาณ 1 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% ให้ครบ 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวใส ซึ่งเป็นสารละลายที่สกัดได้ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำสารละลายใสที่สกัดได้มาเจือจาง 10 เท่าโดยปริมาตร ด้วยการนำสารละลายที่สกัดได้จำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรแล้วปิเปตต์มาจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จำนวน 2.5 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด โดยนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหน่วยเป็นมิลลิกรัม/กรัมของเนื้อผลไม้ แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก.2

ฉ. ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วง

การวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (AOAC method 941.15, 2000)

การสร้างกราฟเบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน

1. ชั่งสารเบต้า-แคโรทีนบริสุทธิ์มาจำนวน 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายเบต้า-แคโรทีนด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน
3. ปิเปตต์สารละลายในข้อ 2 มาจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนได้ 50 มิลลิลิตร
4. ปิเปตต์สารละลายในข้อ 3 จำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน
5. นำสารละลายในข้อ 4 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน เป็น blank
6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 จากนั้นนำสารละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน เป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้

นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเบต้า-แคโรทีนที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ ตัวอย่างเส้นกราฟมาตรฐานอยู่ในภาคผนวก ก รูปภาคผนวก ก. 3

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นละเอียดจำนวน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมแอซีโตน 40% ในเฮกเซนจำนวน 100 มิลลิลิตรลงไป นำไปกวนบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แยกกากเนื้อมะม่วงกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากเนื้อมะม่วงด้วยแอซีโตนจำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และเฮกเซนจำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง นำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนใสของแอซีโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก แล้วล้างแยกเอาแอซีโตนออกโดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นแยกส่วนของน้ำที่มีแอซีโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมแอซีโตน 10% ในเฮกเซน และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (สารผสมแอซีโตน 10% ในเฮกเซน) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยและนำไปหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วงแล้วคำนวณหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อกรัมของเนื้อมะม่วง แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก.3

การวิเคราะห์ทางชีวเคมี

ก. การสกัดเอนไซม์

วิธีการสกัดโปรตีนและเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)

ชั่งเนื้อมะม่วงที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นจัดแล้วเติมสารละลายสำหรับสกัด (extraction solution) คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นบดเนื้อมะม่วงให้ผสมเข้ากับสารละลายที่ใช้สกัดในโกร่งบดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งจนเข้ากันดีประมาณ 1 นาที ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายสำหรับสกัด แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ข. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding ใช้วิธีของ Bradford (1976)

การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตัวอย่างเส้นกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ก รูปภาคผนวก ก. 4

การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก.4

ค. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในตัวอย่างเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) และวิธีของ Lee and Smith (1979)

นำเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ไปสกัดเอนไซม์ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออก-ซิเดส โดยปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต ได้แก่ สารละลายแคทีคอลปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรทันที ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.5 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที แสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก ก.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในตัวอย่างเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) และวิธีของ Lee and Smith (1979)

นำเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่ไปสกัดเอนไซม์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต คือ สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มีกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1% จำนวน 2.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรทันทีด้วยเครื่องสเปก-โตรโฟโตมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที ตัวอย่างวิธีการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ก.6

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี Spread plate (AOAC method 966.23, 2000)

วิธีวิเคราะห์

สุ่มตัวอย่างเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่แช่เยือกแข็ง โดยใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอลล์ 70% ตัดชิ้นเนื้อมะม่วงหรือเนื้อลิ้นจี่มาจำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ แล้วเทสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.5 จำนวน 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นจนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จึงได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1% จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จึงได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

เทอาหาร plate count agar ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้จนอาหารวุ้นแข็งตัว ภายหลังอาหารแข็งตัวแล้ว ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตรงกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอลกอฮอลล์ 70% แล้วปล่อยไว้ให้พออุ่น เกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้า วางหงายจานเพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปในวุ้น จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และวางซ้อนกันประมาณ 3 ชั้น บรรจุในถุงพลาสติกแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี รายงานผลการตรวจนับว่ามี mesophillic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อผลไม้ 1 กรัม วิธีการรายงานผลจำนวนโคโลนีแสดงในภาคผนวก ก.7

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วง

นำเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน และยังบรรจุอยู่ในถุงพอลิเอทิลีนมาหลอมละลาย โดยแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ลักษณะของเนื้อมะม่วงภายหลังการหลอมละลายดังในรูปที่ 3.6

หลังจากนั้นใช้มีดที่คมหั่นชิ้นเนื้อมะม่วงสุกทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองออกเป็น 6 ชิ้น โดยหั่นตามยาว 1 ครั้ง และหั่นตามขวาง 2 ครั้ง แล้วนำแต่ละชิ้นเนื้อมะม่วงใส่ในถ้วยพลาสติกสีขาวที่เตรียมไว้ แล้วนำไปให้ผู้ทดสอบชิมประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชุดทดลอง **ชุดควบคุม**

รูปที่ 3.6 ลักษณะปรากฏเนื้อมะม่วงชุดควบคุมและชุดทดลองภายหลังการหลอมละลายเพื่อนำมาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่

นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ภายหลังการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน มาหลอมละลายโดยแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ลักษณะของเนื้อลิ้นจี่ภายหลังการหลอมละลายดังในรูปที่ 3.7 แล้วนำเนื้อลิ้นจี่ใส่ลงในถ้วยพลาสติกสีขาวที่เตรียมไว้ โดยใช้เนื้อลิ้นจี่ 1 ผลต่อ 1 ถ้วย แล้วนำไปให้ผู้ทดสอบชิมทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ชุดควบคุม **ชุดทดลอง**

รูปที่ 3.7 ลักษณะปรากฏของเนื้อลิ้นจี่ชุดควบคุมและชุดทดลองภายหลังการหลอมละลายเพื่อนำมาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การทดสอบชิมเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่ใช้วิธีการประเมินแบบ Hedonic nine point scale ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนทั้งหมด 50 คน โดยมีเพศชาย 20 คนและเพศหญิง 30 คน มีอายุอยู่ในช่วง 21- 23 ปี เป็นนักศึกษาชั้นปีที่ 3 และ 4 จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารและภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การประเมินคุณภาพได้เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมกับชุดทดลอง ซึ่งแบ่งลักษณะที่ใช้ประเมินเนื้อมะม่วงสุกออกเป็น 6 ลักษณะ ได้แก่ สีที่ปรากฏ (สีเหลืองของเนื้อมะม่วง) ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสหวาน รสเปรี้ยว และการยอมรับโดยรวม และแบ่งลักษณะที่ใช้ประเมินเนื้อลิ้นจี่ออกเป็น 6 ลักษณะ คือ รูปทรงภายนอก ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสหวาน รสเปรี้ยว และการยอมรับโดยรวม โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	6 = ชอบน้อย
2 = ไม่ชอบมาก	7 = ชอบปานกลาง
3 = ไม่ชอบปานกลาง	8 = ชอบมาก
4 = ไม่ชอบน้อย	9 = ชอบมากที่สุด
5 = เฉยๆ	

ตัวอย่างแบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อมะม่วงและเนื้อลิ้นจี่แสดงในภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้งทางกายภาพ เคมี ชีวเคมี และประสาทสัมผัส ของชุดควบคุมและชุดทดลองมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแบบ T-test (Two-samples T-test) และเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือนในแต่ละชุดทดลองและค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ชุดทดลอง โดยทำการวิเคราะห์ผลแบบ One-way ANOVA วิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved