บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุเกษตร

ผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลองศึกษาเป็นผลมะม่วงสุกพันธุ์น้ำดอกไม้ โชคอนันต์ และมหาชนก ที่ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ ตลาดต้นพยอม และตลาดธานินทร์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15±1 องศาเซลเซียส และทำการทดลองในวันรุ่งขึ้น

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance; Mettle-Toledo รุ่น PB3002-S, Greifensee, Switzerland)
2. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance; Mettle-Toledo รุ่น AB-204-S, Greifensee, Switzerland)
3. เครื่องวัดสี (Color Meter รุ่น ColorQuestXE, HunterLab, Virginia, USA)
4. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture analyzer; Stable Micro Systems รุ่น TA.XTi/50, Surrey, UK)
5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Digital refractometer Model PR-101, Atago, Tokyo, Japan)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter; Consort รุ่น C831, Turnhout, Belgium)
7. Digital burette (Brand, Werthiem, Germany)
8. เวอร์เนียร์ คาลิเปอร์ (Digimatic caliper; Mitutoyo รุ่น CD-6, Kanagawa, Japan)
9. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; Binder รุ่น BD/ED/FD with R3- Controller, Neckarsulm, Germany)
10. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; MEMMERT รุ่น UFB 500 และรุ่น UM 500, Frankfurt am Main, Germany)
11. ตู้บ่ม (Incubator; SANYO รุ่น MIR-553, Tokyo, Japan)
12. เครื่องบดสับอาหาร (Moulinex รุ่น AT71R1F, Paris, France)
13. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave; Huxley รุ่น HL-341, Taipei, Taiwan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

14. Stomacher (IUL Masticator 400, IUL Instruments, Barcelona, Spain)
15. Magnetic stirrer (Aris, ME-20, Bangkok, Thailand)
16. Magnetic bar
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
18. จานเพาะเชื้อ
19. Spreader
20. Transfer pipette
21. Pipette pump
22. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
23. Polystylene clampshell ขนาด 5¼ × 5¼ × 2½ นิ้ว ปริมาตร 1,050 ลูกบาศก์เซนติเมตร
24. มีดปอกผลไม้
25. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite, NaOCl; Clorox, Selangor, Malaysia)
2. สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5 เปอร์เซ็นต์ (peroxyacetic acid, PAA; Birlox, Thai Peroxide Co., Ltd., Saraburi, Thailand)
3. สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 6 เปอร์เซ็นต์ (hydrogen peroxide, H_2O_2; ไฮโดรเย่น สหการ, บริษัท สหการโอสถ, กรุงเทพมหานคร, ประเทศไทย)
4. กรดซิตริก (citric acid; OV chemical & supply, Chiang Mai, Thailand)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH; AR grade, Ajex Chemicals, New South Wales, Australia)
6. กรดออกซาลิก (oxalic acid; AR grade, Fisher Chemicals, Leicestershire, UK)
7. 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenolindophenol; Merck, Darmstadt, Germany)
8. วิตามินซีมาตรฐาน (L(+)-ascorbic acid sodium salt [Sodium ascorbate]; Fluka, Steinheim, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 4.0, 7.0 และ 10.0 (buffer solution "HANNA", Padova, Italy)
10. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium dihydrogen phosphate dihydrate, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; reagent grade, Scharlau, Barcelona, Spain)
11. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-sodium hydrogen phosphate dihydrate, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; reagent grade, Scharlau, Barcelona, Spain)
12. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ทั้งหมด (Difgo™ Plate Count Agar, Difco, Benton, Dickinson and company, Maryland, U.S.A.)
13. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์และรา (Difgo™ Potato Dextrose Agar, Difco, Benton, Dickinson and company, Maryland, U.S.A.)
14. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ethyl alcohol; OV chemical & supply, Chiang Mai, Thailand)

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งเป็น 5 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์และสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกของผลมะม่วง

การเตรียมตัวอย่างผลมะม่วง

คัดเลือกผลมะม่วงสุกที่มีขนาดสม่ำเสมอไม่มีโรคและแมลงทำลาย วัดขนาดทั้งความกว้างและความยาวของผลมะม่วงด้วย digimatic caliper เพื่อคำนวณหาพื้นที่ผิวของผลมะม่วง ดังสมการ (Wikipedia, 2008)

$$surface\ \ area \quad = \quad 2\pi a^2 + \frac{2\pi ab}{e}\sin^{-1} e$$

$$e \quad = \quad \sqrt{1 - \frac{a^2}{b^2}}$$

โดยที่ e = ellipticity ; a = equatorial radius ; b = polar radius

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจุ่มผลมะม่วงในสารฆ่าเชื้อ

นำผลมะม่วงไปจุ่มในสารฆ่าเชื้อ 2 ชนิด โดยแบ่งเป็น 4 กรรมวิธี การทดลองแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำใช้ผลมะม่วง 1 ผล ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่จุ่มในสารละลายใด)

กรรมวิธีที่ 2 จุ่มในน้ำประปา

กรรมวิธีที่ 3 จุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Narciso and Plotto, 2005)

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Narciso and Plotto, 2005)

จุ่มผลมะม่วงในสารละลายต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ใช้อัตราส่วนผลมะม่วง 1 ผลต่อสารละลาย 0.5 ลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างผลมะม่วงมาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์-ราที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ plate count agar (PCA) สำหรับวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ potato dextrose agar (PDA) สำหรับวิเคราะห์จำนวนยีสต์-รา (APHA, 2001)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์-รา

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยใช้แท่งแก้วคนจนละลายดี ปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตโดยเติมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจนได้ค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ทั้งหมด (plate count agar, PCA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar จำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์-รา (potato dextrose agar, PDA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar จำนวน 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีทดลอง

นำตัวอย่างผลมะม่วงใส่ลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถุงละ 1 ผล ใช้มือถูผิวผลมะม่วงเบาๆ เป็นเวลา 2 นาที สารละลายตัวอย่างที่ได้มีระดับความเจือจาง 1:10 (10^{-1})

การเจือจางตัวอย่างอาหาร

ใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) และทำให้มีระดับความเจือจางต่อไปด้วยวิธีเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:1,000 (10^{-3}) 1:10,000 (10^{-4}) และ 1:100,000 (10^{-5}) ตามลำดับ (APHA, 2001)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

ก. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี spread plate

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเข้มข้น (10^{-1} ถึง 10^{-5}) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตรงกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้ว spreader ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยให้สารละลายตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้า ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้ววางไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปในวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มโดยวางจานคว่ำลง ที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี (APHA, 2001) ทำซ้ำระดับความเข้มข้นละ 2 จาน

ข. การวิเคราะห์จำนวนยีสต์-รา โดยวิธี spread plate

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารที่เจือจางแต่ละระดับความเข้มข้น (10^{-1} ถึง 10^{-5}) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตรงกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้ว spreader ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยให้สารละลายตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้า ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้ววางไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปในวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในตู้บ่มโดยวางจานคว่ำลง ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของยีสต์-ราจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี (APHA, 2001) ทำซ้ำระดับความเข้มข้นละ 2 จาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกและระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกของผลมะม่วง

คัดเลือกผลมะม่วงสุกที่มีขนาดสม่ำเสมอไม่มีโรคและแมลงทำลาย วัดขนาดความกว้างและความยาวของผลมะม่วงด้วย digimatic caliper นำผลมะม่วงไปจุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซี-แอซีติก ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ โดยแบ่งเป็น 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่จุ่มในสารละลายใด)
กรรมวิธีที่ 2 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 3 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 4 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 5 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 6 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 7 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 เป็นเวลา 5 นาที

นำตัวอย่างผลมะม่วงมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์-รา ด้วยวิธี total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ plate count agar (PCA) และ potato dextrose agar (PDA) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 การศึกษาชนิดของสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการลดจำนวนจุลินทรีย์ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

คัดเลือกผลมะม่วงสุกที่มีขนาดสม่ำเสมอไม่มีโรคและแมลงทำลายจำนวน 10 ผล นำผลมะม่วงไปจุ่มในสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 และที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 หลังจากนั้นนำผลมะม่วงไปปอกเปลือก และหั่นเนื้อมะม่วงสุกด้านละ 8 ชิ้น นำมาผสมคละกัน แล้วจึงแบ่งเป็นแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 30 ชิ้น จุ่มเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นในสารฆ่าเชื้อ 4 ชนิด โดยแบ่งเป็น 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 (ไม่จุ่มทั้งผลมะม่วงและเนื้อมะม่วง)
กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 (จุ่มผลมะม่วงและไม่จุ่มเนื้อมะม่วง)
กรรมวิธีที่ 3 จุ่มเนื้อมะม่วงในสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Riad and Brecht, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 4 จุ่มเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (Narciso and Plotto, 2005)

กรรมวิธีที่ 5 จุ่มเนื้อมะม่วงในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ (Ukuku *et al*., 2005)

กรรมวิธีที่ 6 จุ่มเนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Jiang *et al*., 2004)

จุ่มเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นในสารละลายเป็นเวลา 1 นาที ปล่อยให้สะเด็ดน้ำ บรรจุตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นลงในกล่องพลาสติก polystyrene clamshell จำนวน 10 ชิ้นต่อ clamshell เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน วิเคราะห์จุลินทรีย์ทุกๆ 3 วัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์จุลินทรีย์ในวันที่ 7 ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 clamshell

การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นเพื่อวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย stomacher เป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:10 (10^{-1}) และทำให้มีระดับความเจือจางต่อไปด้วยวิธีเดียวกัน จนได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) และ1:1,000 (10^{-3})

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์-รา ด้วยวิธี total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ plate count agar (PCA) และ potato dextrose agar (PDA) ของการเก็บรักษา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 การศึกษาระดับความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดจำนวนจุลินทรีย์ของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

คัดเลือกผลมะม่วงสุกที่มีขนาดสม่ำเสมอไม่มีโรคและแมลงทำลายจำนวน 14 ผล นำผลมะม่วงไปจุ่มในสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 และที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 หลังจากนั้นปอกเปลือก และหั่นชิ้นเนื้อมะม่วงสุกออกเป็นด้านละ 8 ชิ้น นำมาผสมคละกัน แล้วจึงแบ่งเป็นแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 30 ชิ้น จุ่มเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นในสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ โดยแบ่งเป็น 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม 1 (ไม่จุ่มทั้งผลมะม่วงและเนื้อมะม่วง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม 2 (จุ่มผลมะม่วงและไม่จุ่มเนื้อมะม่วง)
กรรมวิธีที่ 3 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 เป็นเวลา 1 นาที
กรรมวิธีที่ 4 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 เป็นเวลา 1 นาที
กรรมวิธีที่ 5 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 เป็นเวลา 1 นาที
กรรมวิธีที่ 6 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 เป็นเวลา 2 นาที
กรรมวิธีที่ 7 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2 เป็นเวลา 2 นาที
กรรมวิธีที่ 8 สารฆ่าเชื้อจากการทดลองที่ 3 ที่ระดับความเข้มข้นที่ 3 เป็นเวลา 2 นาที

บรรจุตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นลงในกล่องพลาสติก polystyrene clamshell จำนวน 10 ชิ้นต่อ clamshell นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์-รา ด้วยวิธี total plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ plate count agar (PCA) และ potato dextrose agar (PDA) ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 clamshell

การทดลองที่ 5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ และอายุการเก็บรักษาเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

คัดเลือกผลมะม่วงสุกที่มีขนาดสม่ำเสมอไม่มีโรคและแมลงทำลาย นำผลมะม่วงไปจุ่มในสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 และที่ระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 หลังจากนั้นปอกเปลือก และหั่นเนื้อมะม่วงสุกออกเป็นด้านละ 8 ชิ้น จุ่มเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นในสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 และที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้จากการทดลองที่ 4 ปล่อยให้สะเด็ดน้ำ บรรจุเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นลงในกล่องพลาสติก polystyrene clampshell จำนวน 10 ชิ้นต่อ clampshell เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้นมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และเคมีในวันเริ่มต้น และระหว่างการเก็บรักษาทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา โดยทำการวิเคราะห์ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีของชิ้นเนื้อมะม่วง

ทำการวัดสีเนื้อมะม่วงด้านที่ติดกับเปลือก ชิ้นละ 1 ครั้ง โดยใช้เครื่องวัดสี (Color Meter; ColorQuestXE, HunterLab, USA) (รูปที่ 3.1) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย และรายงานผลที่วัดได้เป็นค่า L*, Chroma (C*) และ Hue angle (H^o)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า L* ที่มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีขาว
ค่า a* ที่เป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง ค่า a* ที่เป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว
ค่า b* ที่เป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง ค่า b* ที่เป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน
เมื่อทั้ง a* และ b* มีค่าเป็นศูนย์แสดงว่าวัตถุมีสีเทา
นำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°)

$$\text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

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

ค่า chroma (C*) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเข้มของสีที่ปรากฏ ค่า C* ที่สูงเข้าใกล้ 60 แสดงว่าความเข้มของสีนั้นยิ่งมากขึ้น

ค่า Hue angle หรือค่า H° เป็นค่าที่บอกถึงสีที่แท้จริงของวัตถุ ถ้าค่า H° มีค่าเข้าใกล้ 0 องศา แสดงว่าวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีแดง ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 90 องศา แสดงว่าวัตถุอยู่ในกลุ่มสีเหลือง หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา แสดงว่าวัตถุอยู่ในกลุ่มสีเขียว และหากมีค่าเข้าใกล้ 270 องศา แสดงว่าวัตถุอยู่ในกลุ่มสีน้ำเงิน (รูปที่ 3.2) (McGuire, 1992)

2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัสของชิ้นเนื้อมะม่วง

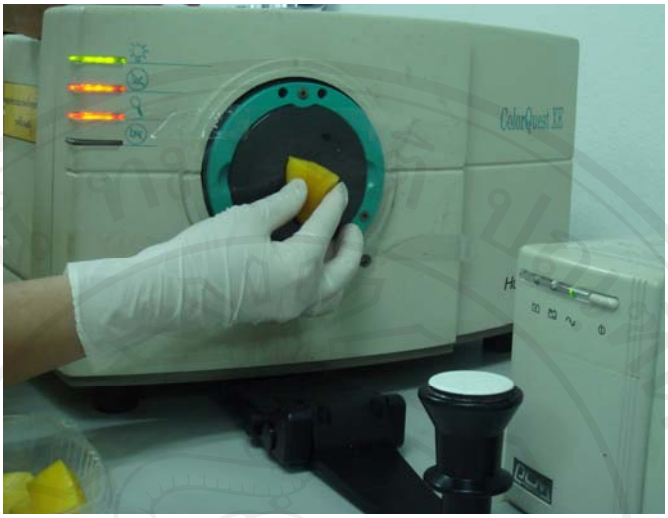
วัดความแน่นเนื้อของเนื้อมะม่วง ชิ้นละ 1 ครั้ง ด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture analyzer; TA.XTi/50) โดยใช้ probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (6 mm-diameter probe) ความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที (รูปที่ 3.3) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 ชิ้น ค่าแรงกดที่วัดได้ มีหน่วยเป็นนิวตัน นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย

3. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

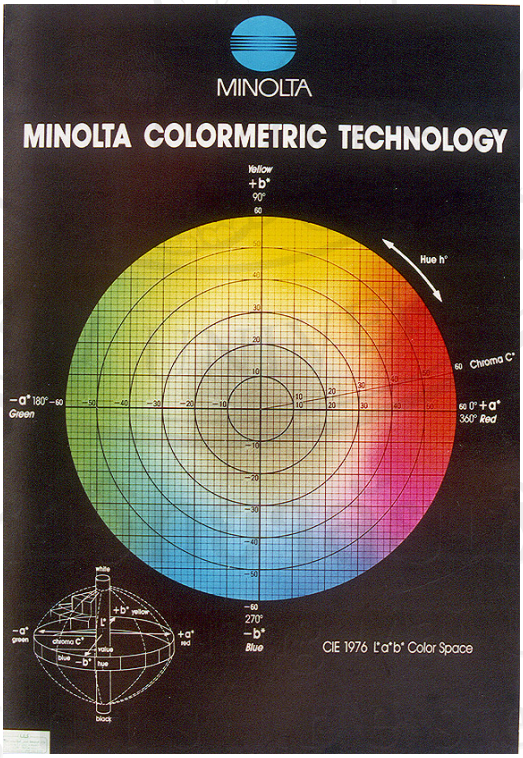
ชั่งน้ำหนักเนื้อมะม่วงก่อน และหลังการเก็บรักษา นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.1 การวัดสีเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น



รูปที่ 3.2 CIE 1976 L* a* b* Color Space

ที่มา: Konica Minolta Sensing, Inc. (1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปที่ 3.3 การวัดความแน่นเนื้อของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

4. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในเนื้อมะม่วงโดยวิธีการไทเทรชันด้วย 2,6-dichlorophenol-indophenol (AOAC Method 967.21, 2000)

หลักการ

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกจะทำปฏิกิริยา oxidation-reduction กับ 2,6-dichlorophenol-indophenol (dye) ดังนี้

ascorbic acid + dye (indicator) ⟶ dehydroascorbic acid + dye (colorless)

2,6-dichlorophenolindophenol เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีสภาวะเป็นกรดจะเป็นสีชมพู และในสภาวะเป็นด่างจะเป็นสีน้ำเงิน ดังนั้น เมื่อวิตามินซีถูกออกซิไดส์หมด dye (excess) จะอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดทำให้ได้จุดยุติเป็นสีชมพู

การสกัดวิตามินซีจากตัวอย่างผลไม้ทำโดยใช้สารละลายกรดออกซาลิก (oxalic acid) หรือสารละลายกรดเมตาฟอสฟอริก (metaphosphoric acid) ซึ่งภาวะที่เป็นกรด จะช่วยป้องกันการเกิด auto-oxidation ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอสคอร์บิกออกซิเดส และช่วยจับโลหะอื่นที่รบกวนต่อการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดออกซาลิก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2. สารละลายอินโดฟีนอล

ชั่ง 2,6-dichlorophenol-indophenol (sodium salt) 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 42 มิลลิกรัม คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1

3. สารละลายวิตามินซีมาตรฐาน

ชั่งกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี 0.05 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 45 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ด้วยสารละลายกรดออกซาลิก (เตรียมทันทีก่อนใช้) สารละลายวิตามินซีที่ได้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตต์สารละลายวิตามินซีมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน flask เติมสารละลายกรดออกซาลิก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ไทเทรตด้วยสารละลายอินโดฟีนอล และบันทึกปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ใช้

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงแต่ละกรรมวิธีมาตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ในเครื่องปั่น เติมสารละลายกรดออกซาลิกลงไป ปั่นให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร แล้วกรอง ปิเปตต์ของเหลวที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายอินโดฟีนอล จนกระทั่งได้สีชมพูอ่อน ซึ่งสีจะคงตัวนานกว่า 15 วินาที บันทึกปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ใช้ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ไทเทรตซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย และนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณวิตามินซีเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของเนื้อมะม่วง ดังนี้

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เนื้อมะม่วง)} = \frac{V_1 \times A \times 100}{V_2 \times B \times W}$$

V_1 คือปริมาตรสารตัวอย่างที่เตรียม (มิลลิลิตร)

V_2 คือปริมาตรสารตัวอย่างที่นำมาไทเทรต (มิลลิลิตร)

A คือปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอลที่ใช้ไทเทรตสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน (มิลลิลิตร)

W คือน้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solids, TSS)

นำเนื้อมะม่วงมาคั้นเอาน้ำออกจากส่วนเนื้อ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ Digital refractometer (Model PR-101, Atago, Japan) ที่อ่านค่าได้ 0-45 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนใช้วัดตัวอย่างน้ำมะม่วงทุกครั้ง ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

6. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Total titratable acidity, TA)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในเนื้อมะม่วง โดยวิธีไทเทรชันด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน และคำนวณผลในรูปของกรดซิตริกต่อ 100 กรัมเนื้อมะม่วง (AOAC method 942.15, 2000)

หลักการ

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรชัน เป็นการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นแน่นอน ทำปฏิกิริยากับกรดในสารละลายตัวอย่างอาหาร โดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดและด่างที่ทำปฏิกิริยากันพอดี หรือจุดสมมูล ซึ่งทราบได้จากการใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เพราะฟีนอล์ฟทาลีนจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพูที่จุดที่พอดีหรือใกล้เคียงกับจุดสมมูล จุดที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสีจะเรียกว่า จุดยุติ หากใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง วัดหาค่าพีเอช ณ จุดสมมูลระหว่างการไทเทรต ค่าพีเอชของสารละลาย ณ จุดสมมูลจะมีค่ามากกว่า 7 (ประมาณ 8.1-8.2) เนื่องจากเป็นการไทเทรตระหว่างกรดอ่อนกับด่างแก่ (Sadler and Murphy, 2003)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันแต่ละกรรมวิธีมาตัวอย่างละ 10 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากัน นำสารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงยุติ ที่ค่าพีเอช 8.1 บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างมาตรฐานที่ใช้ ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง และหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริกต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสดโดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.007 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (เทียบในรูปกรดซิตริก) = $\frac{\text{ความเข้มข้น NaOH} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times 0.007 \times 100}{\text{น้ำหนักของเนื้อมะม่วง (g)}}$

7. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่าพีเอช, pH)

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน มาวัดค่าพีเอช (อาจเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วลงไปเล็กน้อยเพื่อเจือจางแล้วนำมาวัดค่าพีเอช) โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Consort รุ่น C831) และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้ง ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องวัดโดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 4.0, 7.0 และ 10.0 (Buffer solution "HANNA", Italy) ตามลำดับ ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

8. อัตราส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (TSS/TA)

คำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง TSS และ TA ที่วิเคราะห์ได้

9. การทดสอบการยอมรับของผู้ทดสอบชิม

ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 5 คน ทำการทดสอบชิมและให้คะแนนความชอบในลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะสีที่ปรากฏ ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ hedonic scale 9 ระดับ ซึ่งมีระดับการให้คะแนน ดังนี้ (ไพโรจน์, 2535)

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

10. การตัดสินว่าสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

การพิจารณาว่าเนื้อมะม่วงสุกพร้อมบริโภคสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาจะใช้เกณฑ์ ดังนี้

- คะแนนการยอมรับโดยรวมของผู้ทดสอบชิมที่ได้รับ น้อยกว่า 5.0 คะแนน
- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มากกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อกรัม
  ยีสต์ มากกว่า 1×10^4 โคโลนีต่อกรัม
  รา มากกว่า 500 โคโลนีต่อกรัม
  (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2547)
- ลักษณะปรากฏที่ฉ่ำน้ำ มีสีที่คล้ำขึ้น และการเกิดสีน้ำตาลของเนื้อมะม่วงสุกหั่นชิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved