บทที่ 3
วัตถุดิบ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะม่วงสุกพันธุ์โชคอนันต์ (*Mangifera indica* Linn. cv. Chok-Anan) ซื้อจากตลาดสันป่าข่อย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2546 โดยใช้ผลมะม่วงที่มีระยะสุกทางการค้า เปลือกมีสีเหลืองมากกว่า 80% และมีน้ำหนักผลอยู่ในช่วง 250-300 กรัม จำนวนประมาณ 300 ผล

3.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ

(1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo Spectronic : Biomate 5, U.S.A.)

(2) เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Hettich Zentrifugen : Rotina 46R, Germany)

(3) เครื่องวัดสี (Colorimeter, Hunterlab : ColorQuest II, U.S.A.)

(4) เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Hanna : 213, U.S.A.)

(5) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance Dielhemim : HF-3000G, Switzerland)

(6) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorius : A120S, Germany)

(7) เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, National : NN-K652, Japan)

(8) หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave, Hirayama : HA-300MIV, Japan)

(9) ตู้บ่ม (Incubator, Heraeus : B6200, England)

(10) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert : UM100-UM800, Germany)

(11) ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer, Sanyo : SF-C 992 NG, Thailand)

(12) ตู้ดูดควัน (Hood, Toplab Design and Technology, England)

(13) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(14) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer, Atago : N1, Japan)

(15) เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and Magnetic stirrer, Whatman : HPMS, England)

(16) เครื่องตีป่น (Laboratory blender stomacher, Seward Chemical : 400, England)

(17) เครื่องปั่นผสม (Vortex, Scientific Industries : G-560E, U.S.A.)

(18) เครื่องปั่น (Blender, Imarflex : IF-308, Thailand)

(19) ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Micropipette, Wiggen hauser)

(20) ดิวเวตต์แก้ว

(21) กระดาษกรอง เบอร์ 2 และ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Whatman, England)

(22) ถุงอลูมิเนียมฟอยด์ (NYLON/PE/Al/L-LDPE) ขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 23 x 28 เซนติเมตร ผลิตโดยบริษัท สตรองแพ็ค จำกัด กรุงเทพฯ

3.2.2 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมี

3.2.2.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมเนื้อมะม่วงสุกก่อนการแช่เยือกแข็ง

(1) สารละลายผสมกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5% : เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก (Citric acid, Food Grade, เวชวิทย์, Thailand) จำนวน 10 กรัม และชั่งแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride-2-hydrate, Food Grade, เวชวิทย์, Thailand) จำนวน 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

(2) สารละลายผสมกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.0% : เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก จำนวน 10 หรือ 200 กรัม และชั่งแคลเซียมคลอไรด์ จำนวน 20 หรือ 400 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรหรือ 20 ลิตร ตามลำดับ

(3) สารละลายผสมกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% และแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5% : เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก จำนวน 10 กรัม และชั่งแคลเซียมคลอไรด์ จำนวน 25 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (ความเข้มข้นคลอรีน 20 และ 300 ppm) : เตรียมตามกระบวนการผลิตของ บริษัท เชียงใหม่โฟรเซ่นฟูดส์ จำกัด (มหาชน)

3.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดส

(1) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, E. Merck, Germany) (NaCl, MW = 58.44 g/mol) จำนวน 11.7467 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

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

(3) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate, AR Grade, E. Merck, Germany) ($NaH_2PO_4.H_2O$, MW = 137.99 g/mol) จำนวน 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(4) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 : เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ 3.2.2.2(3) จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายจากข้อ 3.2.2.2(2) พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2

(5) สารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ : เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ 3.2.2.2(4) จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจากข้อ 3.2.2.2(1) จำนวน 12.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

(1) สารละลายโซเดียมแอซีเทตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งโซเดียมแอซีเทตแอนไฮดรัส (Sodium acetate, AR Grade, E. Merck, Germany) (CH_3COONa, MW = 82.04 g/mol) จำนวน 0.8377 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2) กรดแอซีติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ : เตรียมโดยปิเปตต์กรดแอซีติก (Glacial acetic acid, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 0.57 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(3) สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 : เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ 3.2.2.3(1) จำนวน 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายจากข้อ 3.2.2.3(2) พร้อมคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0

(4) สารละลายกัวอะคอลความเข้มข้น 1% : เตรียมโดยชั่งกัวอะคอล (Guaiacol, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(5) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% : เตรียมโดยชั่งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% (Hydrogen peroxide 30%, AR Grade, Carlo Erba, Germany) จำนวน 3.33 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(6) สารละลายสับสเตรตของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส คือ สารละลายโซเดียม-แอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 (ซึ่งประกอบด้วยกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1%) : เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ 3.2.2.3(3) จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจากข้อ 3.2.2.3(4) จำนวน 125 มิลลิลิตรและสารละลายจากข้อ 3.2.2.3(5) จำนวน 25 มิลลิลิตรลงไป ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

* สารละลายในข้อ 3.2.2.3(4), 3.2.2.3(5) และ 3.2.2.3(6) เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

(1) สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 9.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 6.97 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(3) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 : เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ 3.2.2.4(2) จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

(4) สารละลายแคทีคอลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ : เตรียมโดยชั่งไพโร-แคทีคอล (Pyrocatechol, AR Grade, Fluka, Switzerland) ($C_6H_6O_6$, MW = 110.11 g/mol) จำนวน 2.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

* สารละลายในข้อ 3.2.2.4(4) เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทดลอง

3.2.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

(1) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ : เตรียมโดยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.2.2(5)

(2) สารละลายโปรตีนมาตรฐานเตรียมโดย

(2.1) stock solution ความเข้มข้น 1% : เตรียมโดยชั่งโปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2.2) working solution ความเข้มข้น 0.02% (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) : เตรียมโดยปิเปตสารละลายข้อ 3.2.2.5(2.1) จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยสารละลายข้อ 3.2.2.5(1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) สารละลายสีย้อม : เตรียมโดยชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% (Ethanol 95%, Food Grade, สยามเอทานอล, Thailand) จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (*ortho*-Phosphoric acid, E. Merck, Germany) จำนวน 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3.2.2.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, E. Merck, Germany) (NaOH) จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบมาตรฐาน (standardization) โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, Fluka, Switzerland) ($C_5H_8KO_4$) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายต่าง

3.2.2.7 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมด

(1) สารละลาย Carrez No.1 : ละลายสังกะสีแอซีเทต (Zinc acetate dihydrate, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดแอซีติก จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(2) สารละลาย Carrez No.2 : ละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

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

(4) สารละลาย Fehling No.2 : ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate, Carlo

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Erba, Germany) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

(5) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล : ตวงกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 528.33 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

(6) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล : ชั่งโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ จำนวน 100 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

(7) สารละลายเมทิลีนบลูอินดิเคเตอร์ : ละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue, J.T. Baker, U.S.A.) จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.2.2.8 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

(1) เบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน (Standard β-carotene, Fluka, Switzerland)

(2) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, AR Grade, E. Merck, Germany)

(3) แอซีโตน (Acetone, AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

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

(5) สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน : เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจากข้อ 3.2.2.8(3) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(4) จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

(6) สารละลายผสมของแอซีโตน 40% ในเฮกเซน : เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจากข้อ 3.2.2.8(3) จำนวน 400 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(4) จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.9 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

(1) สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% : เตรียมโดยตวงเอทานอลความเข้มข้น 95% จำนวน 210.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร

(2) Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% : เตรียมโดยปิเปต Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu reagent, Fluka, Switzerland) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

(3) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% : เตรียมโดยชั่งโซเดียม-คาร์บอเนตแอนไฮดรัส (Sodium carbonate anhydrous, Carlo Erba, Germany) จำนวน 7.5 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร

(5) สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร : เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก (Gallic acid, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 0.01 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร

3.2.2.10 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

(1) สารละลายเพปโทนความเข้มข้น 0.1% : เตรียมโดยชั่งเพปโทน (Peptone, AR Grade, E. Merck, Germany) จำนวน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลองแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอจากข้อ 3.2.1(8) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

(2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar : เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Plate Count Agar, Becto® Difco Laboratory, U.S.A.) จำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเข้าเตาไมโครเวฟจากข้อ 3.2.1(7) จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอจากข้อ 3.2.1(8) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.11 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา

(1) สารละลายเพปโทนความเข้มข้น 0.1% : เตรียมโดยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.2.10(1)

(2) อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar : เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา (Becto® Potato Dextrose Agar, Difco Laboratory, U.S.A.) จำนวน 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำเข้าเตาไมโครเวฟจากข้อ 3.2.1(7) จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอจากข้อ 3.2.1(8) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3.5 โดยเติมสารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10% จากข้อ 3.2.2.11(3) จำนวน 19 มิลลิลิตรลงไป (อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ใช้สารละลายกรดทาร์ทาริก 1.9 มิลลิลิตร)

(3) สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10% : เตรียมโดยชั่งกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid, Carlo Erba Reagent, Germany) จำนวน 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอจากข้อ 3.2.1(8) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 วิธีการวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาวิธีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์โชคอนันต์ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

นำผลมะม่วงจากข้อ 3.1 ล้างด้วยน้ำสะอาดปอกเปลือกและฝานแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ด้วยมือคนโดยใช้มีดปอก แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (ไม่แช่ในสารละลาย) และชุดทดลองที่นำไปแช่ในสารละลาย ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง โดยใช้มะม่วง 1 ผล ต่อ 1 ซ้ำ

ชุดควบคุม นำเนื้อมะม่วงมาสกัดเอนไซม์ตามข้อ 3.3.1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามข้อ 3.3.2

ชุดทดลอง นำเนื้อมะม่วงแช่ในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% (รุจิภรณ์, 2546) ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5, 2.0 หรือ 2.5% ตามลำดับ (Burnette, 1977; Salunkhe and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Desai, 1984; Luna-Guzman and Barrett, 2000; General Chemical Industrial Products, 2004) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำเนื้อมะม่วงไปสกัดเอนไซม์ตามข้อ 3.3.1 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามข้อ 3.3.2

เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในเนื้อมะม่วงจากชุดควบคุมและชุดทดลองที่ผ่านการยับยั้งกิจกรรมด้วยสารละลายผสมของกรดซิตริกและแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายที่สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุดไปใช้ในการเก็บรักษาเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์โชคอนันต์แช่เยือกแข็งในขั้นตอนที่ 2 โดยคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นหน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหลือ (%) วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของชุดควบคุมและชุดทดลองที่ได้ในแต่ละทรีตเมนต์มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการเปรียบเทียบสองตัวแทน (T-Test) ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เหลือ (%) วิเคราะห์ผลด้วยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10

3.3.1 การสกัดสารละลายเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)]

นำเนื้อมะม่วงหั่นชิ้นไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.2.1(18) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปสกัดเอนไซม์ออกจากเนื้อมะม่วง โดยชั่งเนื้อมะม่วงที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นจัดแล้วเติมสารละลายสำหรับสกัด (extraction solution) คือ สารละลายโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 3.2.2.2(5) จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นบดเนื้อมะม่วงเข้ากับสารละลายที่ใช้สกัดในโกร่งบดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งจนเข้ากันดีประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิจากข้อ 3.2.1(2) ความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)]

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต คือ สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 (ซึ่งประกอบด้วยกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1%) จากข้อ 3.2.2.3(6) จำนวน 2.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านค่าทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นหน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding [ใช้วิธีของ Bradford (1976)]

การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.02% จากข้อ 3.2.2.5(2.2) จำนวน 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 3.2.2.5(1) ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายสีย้อมจากข้อ 3.2.2.5(3) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากข้อ 3.2.2.5(1) ลงไป 100 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นเติมสารละลายสีย้อมจากข้อ 3.2.2.5(3) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดส สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และปริมาณจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาเนื้อมะม่วงสุกพันธุ์โชคอนันต์แช่เยือกแข็ง

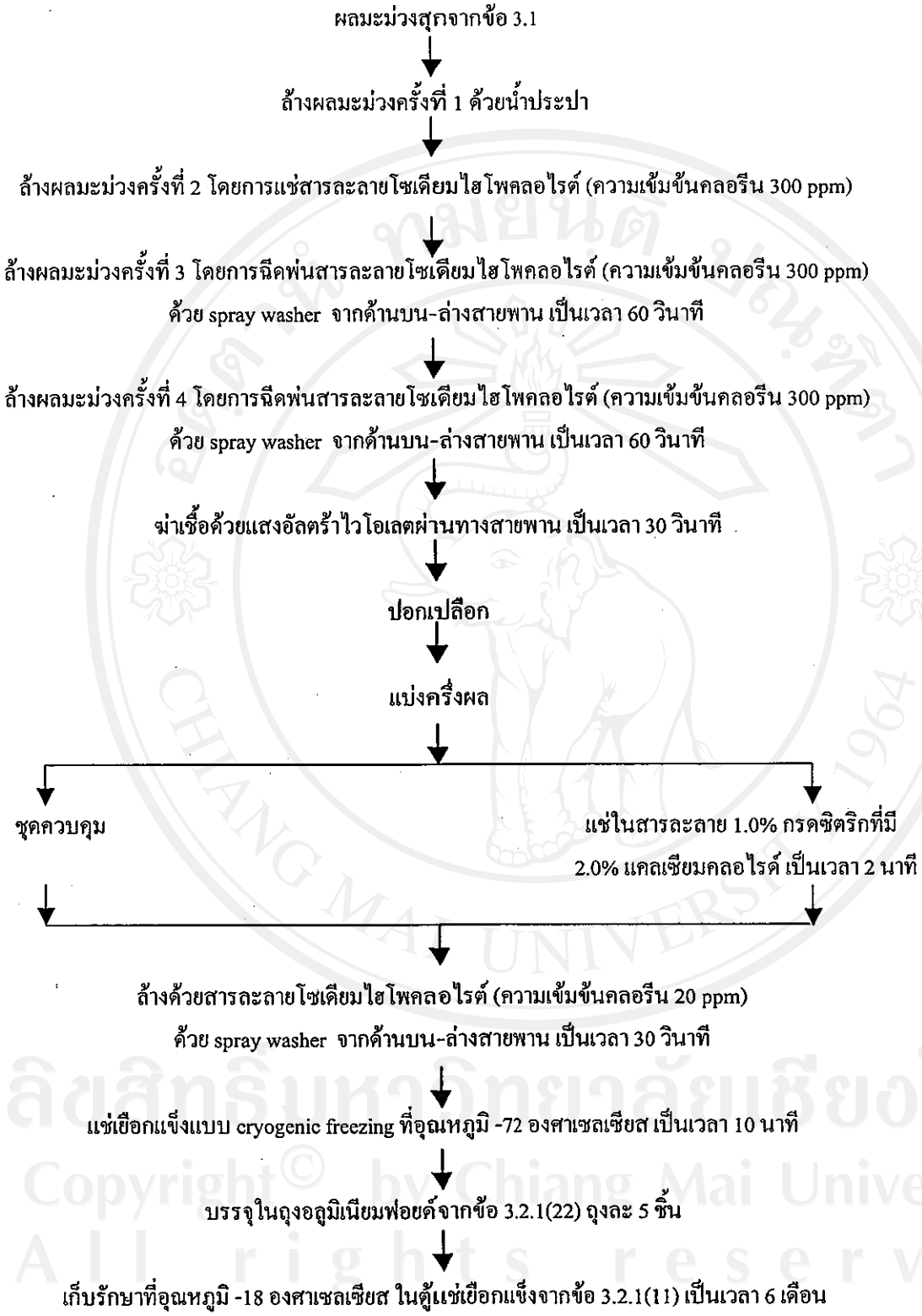
นำผลมะม่วงจากข้อ 3.1 แปรรูปด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็ว (Individual Quick Freezing, IQF) ด้วยเครื่องแช่เยือกแข็งแบบ cryogenic freezing ตามกระบวนการผลิตของ บริษัทเชียงใหม่โฟรเซ่นฟูดส์ จำกัด (มหาชน) ตั้งอยู่ที่ 299 หมู่ 3 ถนนเชียงใหม่-พร้าว ตำบลแม่แฝกใหม่ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ มี 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (ไม่แช่ในสารละลาย) และชุดทดลองที่นำไปแช่ในสารละลายที่สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ดีที่สุด ซึ่งได้จากผลการทดลองขั้นตอนที่ 1 ดังนี้

ชุดควบคุม นำเนื้อมะม่วงไปแช่เยือกแข็ง จากนั้นเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วงตามข้อ 3.4.1 แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสตามข้อ 3.4.2 (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค) และการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และปริมาณจุลินทรีย์ตามข้อ 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5 ตามลำดับ

ชุดทดลอง แช่เนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0% ที่มีแคลเซียม-คลอไรด์ความเข้มข้น 2.0% เป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง จากนั้นเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วงตามข้อ 3.4.1 แล้ววิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติต่างๆ โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับชุดควบคุม

ตัวอย่างเนื้อมะม่วงสุกแช่เยือกแข็งบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยด์จากข้อ 3.2.1(22) จำนวน 130 ถุง จำนวนถุงละ 5 ชิ้น เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ในตู้แช่เยือกแข็งจากข้อ 3.2.1(11) ที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุ่มตัวอย่างออกมาเพื่อวิเคราะห์ทุกเดือน เดือนละ 18 ถุง ได้แก่ ชุดควบคุม 9 ถุง และชุดทดลอง 9 ถุง ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง (triplicate with triplicate determination) แต่ละซ้ำใช้เนื้อมะม่วงสุกแช่เยือกแข็งจำนวน 3 ถุงปั่นผสมรวมกัน แสดงผลการทดลองโดยคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.1 กระบวนการแปรรูปเนื้อมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์แช่เยือกแข็งแบบ cryogenic freezing ตามกระบวนการผลิตของ บริษัท เชียงใหม่โฟรเซ่นฟูดส์ จำกัด (มหาชน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองของชุดควบคุมและชุดทดลองที่ได้ในแต่ละเดือนมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการเปรียบเทียบสองตัวแทน (T-Test) ส่วนการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา ค่าเฉลี่ยเวลาเก็บรักษาและค่าเฉลี่ยชุดการทดลอง วิเคราะห์ผลด้วยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10

3.4 วิธีการวิเคราะห์

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะม่วง

การหลอมละลายชิ้นเนื้อมะม่วงสุกแช่เยือกแข็ง ทำโดยนำชิ้นเนื้อมะม่วงที่ยังบรรจุอยู่ในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ มาแช่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหั่นชิ้นเนื้อมะม่วงแต่ละชิ้นเป็น 4 ชิ้นเล็ก แล้วปั่นมะม่วงแต่ละซ้ำรวมกันด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.2.1(18) ที่ความเร็ว 2 เป็นเวลา 1 นาที นำมะม่วงที่ปั่นได้บรรจุในถุงพลาสติกเย็น (PE) ซ้ำละ 3 ถุง แต่ละถุงทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ทันทีภายหลังจากการปั่นชิ้นเนื้อมะม่วง จากนั้นเก็บรักษาเนื้อมะม่วงที่ปั่นแล้วในถุงอลูมิเนียมฟอยด์จากข้อ 3.2.1(22) อีกชั้น แล้วเก็บในตู้แช่เยือกแข็งจากข้อ 3.2.1(11) ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพทางเคมี และสุ่มชิ้นเนื้อมะม่วงมาวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ก่อนเก็บรักษา และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน

3.4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.4.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)]

นำเนื้อมะม่วงไปสกัดเอนไซม์ตามข้อ 3.3.1 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสตามข้อ 3.3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส [ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978)]

นำเนื้อมะม่วงไปสกัดเอนไซม์ตามข้อ 3.3.1 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออก-ซิเดส โดยปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต ได้แก่ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 จากข้อ 3.2.2.4(3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายแคทีคอลจากข้อ 3.2.2.4(4) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านค่าทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.5 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นหน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

3.4.2.3 ปริมาณโปรตีน [ใช้วิธีของ Bradford (1976)]

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1 ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding ตามข้อ 3.3.3

3.4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพด้านสี

นำเนื้อมะม่วงที่ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.4.1 มาวัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสีจากข้อ 3.2.1(3)

วิธีวิเคราะห์

ปรับเทียบมาตรฐานของเครื่องวัดสี (calibration) โดยใช้แผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาวและเทานำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นผสมมาใส่ในคิวเวตต์ แล้วนำไปวัดค่าสีอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ รายงานค่าสีที่วัดได้เป็นค่า L*, a* และ b* นำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°) โดยใช้สูตรต่อไปนี้ (สุดนธ์ชื่นและวรรณวิบูลย์, 2543)

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

Hue angle ; $H^{\circ} = ATAN(b^*/a^*)/6.2832 \times 360$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

L* = The lightness factor values เป็นค่าแสดงถึงความสว่าง (lightness) ของวัตถุ ถ้าค่า L* เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีความทึบ ถ้าค่า L* เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง 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

H° = เป็นค่าแสดงสีที่ปรากฏให้เห็น คำนวณได้อยู่ในรูปขององศาในวงกลม ซึ่งจะมีค่าเริ่มต้นตั้งแต่ 0° จนถึง 360° ซึ่งค่า H° นี้บอกถึงสีที่แท้จริงที่ปรากฏให้เห็น โดยสีในแถบแกนหลัก ได้แก่ 0° และ 360 สีแดง 90° สีเหลือง และ 270° สีน้ำเงิน ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.4.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.4.4.1 ค่าพีเอช

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.4.1 จำนวน 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 กรัม มาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอชจากข้อ 3.2.1(4) และก่อนใช้เครื่องวัดพีเอชทุกครั้ง ปรับเทียบมาตรฐานของเครื่องวัดพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 7.1 และ 4.1 ตามลำดับ

3.4.4.2 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ [ใช้วิธีของ AOAC (2000)]

วัดปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในตัวอย่างเนื้อมะม่วงโดยวิธีการไทเทรชันด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน แล้วคำนวณผลในรูปของกรดซิตริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.4.1 จำนวน 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากัน โดยใส่แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ในบีกเกอร์แล้วนำไปวางบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า จากข้อ 3.2.1(15) นำสารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากข้อ 3.2.2.6 โดยใช้เครื่องวัดพีเอชจากข้อ 3.2.1(4) ไทเทรตจนอ่านค่าพีเอชของสารละลายตัวอย่างได้เท่ากับ 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ทดลอง 3 ซ้ำ นำไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริก โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.07 กรัม

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%) (ในรูปกรดซิตริก)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times 0.07 \times 100}{\text{น้ำหนักเนื้อมะม่วง (g)}}$$

3.4.4.3 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.4.1 มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้จากข้อ 3.2.1(14) ซึ่งวัดค่าได้ระหว่าง 0-32% ปรับเทียบมาตรฐานโดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนการวัดตัวอย่างมะม่วงทุกครั้ง

3.4.4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมด [ใช้วิธีของ Lane and Eynon (ลักขณาและนิธิยา, 2544)]

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นด้วยเครื่องปั่นจากข้อ 3.4.1 มาจำนวน 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นพอประมาณให้เนื้อมะม่วงกระจายตัว จากนั้นเติมสารละลาย Carrez No. 1 และ No. 2 ลงไป จากข้อ 3.2.2.7(1) และ 3.2.2.7(2) อย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากข้อ 3.2.1(21) เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตต์ขนาด 50 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตต์สารละลาย Fehling No. 1 และ No. 2 จากข้อ 3.2.2.7(3) และ 3.2.2.7(4) อย่างละ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่แท่งแม่เหล็กแล้วนำไปวางบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้าจากข้อ 3.2.1(15) ต้มจนเดือดไทเทรตกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 หยด ไทเทรตจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ไทเทรตสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Fehling โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตต์ลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไทเทรตครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือดนาน 2 นาที หยดสารละลายเมทิลีนบลูจากข้อ 3.2.2.7(7) จำนวน 1 หยด ไทเทรตจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน แสดงในภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างมา 40 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล จากข้อ 3.2.2.7(5) ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิจากข้อ 3.2.1(13) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 นอร์มัล จากข้อ 3.2.2.7(6) จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรตต์ ไทเทรตกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน

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

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + D_1

เมื่อ D_1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน

D_2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4.5 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วง [ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000)]

การสร้างกราฟเบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน

(1) ชั่งสารเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานจากข้อ 3.2.2.8(1) จำนวน 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานด้วยคลอโรฟอร์มจากข้อ 3.2.2.8(2) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร

(2) ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 4.5(1) ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(3)

(3) ปิเปตต์สารละลายในข้อ 4.5(2) จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(3) จนได้ 50 มิลลิลิตร

(4) ปิเปตต์สารละลายในข้อ 4.5(3) จำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(5)

(5) นำสารละลายในข้อ 4.5(4) ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(5) เป็น blank

(6) ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 จากนั้นนำสารละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4.5(4) ทั้งหมดที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(5) เป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้

(7) นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเบต้า-แคโรทีนที่มีหน่วยเป็นส่วนต่อล้านส่วน (ppm) กับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ ดังแสดงในรูปที่ ค.2 (ภาคผนวก ค)

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ [ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2000)]

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงปั่นละเอียดจากข้อ 3.4.1 จำนวน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารผสมแอซีโตน 40% ในเฮกเซน จำนวน 100 มิลลิลิตรจากข้อ 3.2.2.8(6) ลงไป นำไปกวนบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้าจากข้อ 3.2.1(15) เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากข้อ 3.2.1(21) แยกกากเนื้อมะม่วงกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากเนื้อมะม่วงด้วยแอซีโตนจากข้อ 3.2.2.8(4) จำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.8(3) จำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง นำส่วนใสของแอซีโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก แล้วล้างแยกเอาแอซีโตนออก โดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีแอซีโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 จากข้อ 3.2.1(21) โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควันจากข้อ 3.2.1(12) จนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ 3.2.2.7(5) และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (สารผสมแอซีโตน 10% ในเฮกเซน) ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วง วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค

3.4.4.6 สารประกอบฟีนอลทั้งหมด [ใช้วิธีของ Singleton and Rossi (1965) และ Ketsa and Atantee (1998)]

การสร้างกราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน [ใช้วิธีของ Ketsa and Atantee (1998)]

โดยการปิเปตต์สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากข้อ 3.2.2.9(4) จำนวน 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นโดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จากข้อ 3.2.2.9(2) จำนวน 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% จากข้อ 3.2.2.9(3) ลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

การสกัดสารประกอบฟีนอลทั้งหมด [ใช้วิธีของ Ketsa and Atantee (1998)]

โดยการชั่งเนื้อมะม่วงที่บดละเอียดจากข้อ 3.4.1 จำนวน 3 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นแล้ว เติมเอทานอลความเข้มข้น 80% จากข้อ 3.2.2.9(1) ที่เย็นลงไปจำนวน 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิจากข้อ 3.2.1(2) ด้วยความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวใสซึ่งเป็นสารละลายที่สกัดได้ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด [ใช้วิธีของ Singleton and Rossi (1965)]

นำสารละลายใสที่สกัดได้มาเจือจาง 10 เท่าโดยปริมาตร ด้วยการนำสารละลายที่สกัดได้จำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วปิเปตต์มาจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จากข้อ 3.2.2.9(2) จำนวน 2.5 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% จากข้อ 3.2.2.9(3) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1(1) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/กรัมเนื้อมะม่วง วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งออกมาวิเคราะห์ภายหลังการแช่เยือกแข็งทันที และเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน โดยวิเคราะห์ดังนี้

3.4.5.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด [ใช้วิธี Pour plate (AOAC, 2000)]

วิธีวิเคราะห์

(1) ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ตัดถุงให้เปิด และตัดเนื้อมะม่วงมาจำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่บรรจุสารละลายเพปโทนจากข้อ 3.2.2.10(1) จำนวน 90 กรัม นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นจากข้อ 3.2.1(16) จนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

(2) ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 จากข้อ 3.4.5.1(1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายเพปโทน จำนวน 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยเครื่องปั่นผสมจากข้อ 3.2.1(17) ได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

(3) นำตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 จากข้อ 3.4.5.1(2) มาเจือจางให้เป็น 1:1,000 หรือ 10^{-3} โดยวิธีเดียวกับข้อ 3.4.5.1(2)

การตรวจนับจุลินทรีย์

ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) จากข้อ 3.4.5.1(1), 3.4.5.1(2) และ 3.4.5.1(3) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar จากข้อ 3.2.2.10(2) ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มในตู้บ่มจากข้อ 3.2.1(17) ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามกำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับว่ามี mesophilic aerobic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัม

* ปิเปตต์และจานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อนจากข้อ 3.2.1(10) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4.5.2 ปริมาณยีสต์และรา [ใช้วิธี Pour plate (AOAC, 2000)]

วิธีวิเคราะห์

(1) ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ตัดถุงให้เปิด และตัดเนื้อมะม่วงมาจำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่บรรจุสารละลายเพปโทนจากข้อ 3.2.2.11(1) จำนวน 90 กรัม นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นจากข้อ 3.2.1(16) จนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

(2) ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 จากข้อ 3.4.5.2(1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายเพปโทน จำนวน 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมจากข้อ 3.2.1(17) ได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) นำตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 จากข้อ 3.4.5.2(2) มาเจือจางให้เป็น 1:1,000 หรือ 10^{-3} โดยวิธีเดียวกับข้อ 3.4.5.2(2)

การตรวจนับจุลินทรีย์

ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) จากข้อ 3.4.5.(1), 3.4.5.2(2) และ 3.4.5.2(3) ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar จากข้อ 3.2.2.11(2) ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มในตู้บ่มจากข้อ 3.2.1(17) ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72±3 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามกำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับ ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัม

* ปิเปตต์และจานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อในตู้อบลมร้อนจากข้อ 3.2.1(10) ที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved