บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพันธุ์พืช

บรอกโคลี (*Brassica oleracea* var. *Italica*) พันธุ์ ท็อปกรีน (Top green) ซึ่งเก็บเกี่ยวในระยะความแก่ทางการค้า จากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนแปะ จังหวัดเชียงใหม่ ส่งมาที่งานคัดบรรจุมูลนิธิโครงการหลวง แล้วส่งมายังหน่วยวิจัยหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรถขนส่งของมูลนิธิโครงการหลวง

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 (บริษัท ATAGO, ประเทศญี่ปุ่น) อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์

2.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (digital spectrophotometer) รุ่น Spectro 23 (บริษัท LaboMed, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (thermo spectronic) รุ่น Genesys 10UV-Scanning (บริษัท CE, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.3 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่งรุ่น EL T602 (บริษัท Sartorius, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200 (บริษัท AND, ประเทศญี่ปุ่น) ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

2.4 ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น Nichipet EX (บริษัท NICHIRYO, ประเทศญี่ปุ่น) และไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร รุ่น M20813J (บริษัท GILSON, ประเทศฝรั่งเศส)

2.5 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน รุ่น SP-18420-26 (บริษัท Nuova II, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.6 Water bath รุ่น WB 10 (บริษัท Memmert, ประเทศเยอรมนี)

2.7 เครื่องหมุ่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงปรับอุณหภูมิต่ำ (high refrigerate speed centrifuge and accessories) รุ่น Unicen 15 DR (บริษัท Herolab, ประเทศเยอรมนี)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร และกระดาษกรอง Whatman No. 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร (บริษัท Whatman International, ประเทศอังกฤษ)

2.9 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น LC203LD (บริษัท LAW-CHAIN, ประเทศไทย)

2.10 หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น HL-300 (บริษัท Memmert, ประเทศเยอรมนี)

2.11 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น AS1324 (บริษัท Standards, ประเทศออสเตรเลีย)

2.12 ตู้อบไมโครเวฟ (microwave) รุ่น EMO-900T (บริษัท Sanyo, ประเทศญี่ปุ่น)

2.13 Syringe ขนาด 100 ไมโครลิตร (บริษัท Hamilton, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.14 เครื่อง Vortex-Genie 2 รุ่น G-560E (บริษัท Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.15 เตาอบ

2.16 ตู้ UV

2.17 เทอร์โมมิเตอร์

2.18 กล้องถ่ายรูป รุ่น DSC-T5 Cybershot (บริษัท SONY, ประเทศญี่ปุ่น)

2.19 เครื่องวัดสี (Chroma meter) ตัวเครื่องรุ่น CR-300 หัววัด CR-310 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (บริษัท Minolta, ประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียด ดังนี้ คือ L* = The lightness factor (value)

- ค่า L* เท่ากับ 100 เมื่อวัตถุมีสีขาว
- ค่า L* เท่ากับ 0 เมื่อมีวัตถุสีดำ

ค่า chroma
- มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)
- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

คำนวณหาค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี (McGuire, 1992)

ค่า hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992) THETA = (arctangent (b*/a*)/6.2832*360)

ถ้า a > 0 และ b > 0 ; ค่า h° = THETA

ถ้า a < 0 และ b < 0 ; ค่า h° = THETA + 180

ถ้า a < 0 และ b > 0 ; ค่า h° = THETA + 270

ถ้า a > 0 และ b < 0 ; ค่า h° = THETA + 360

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

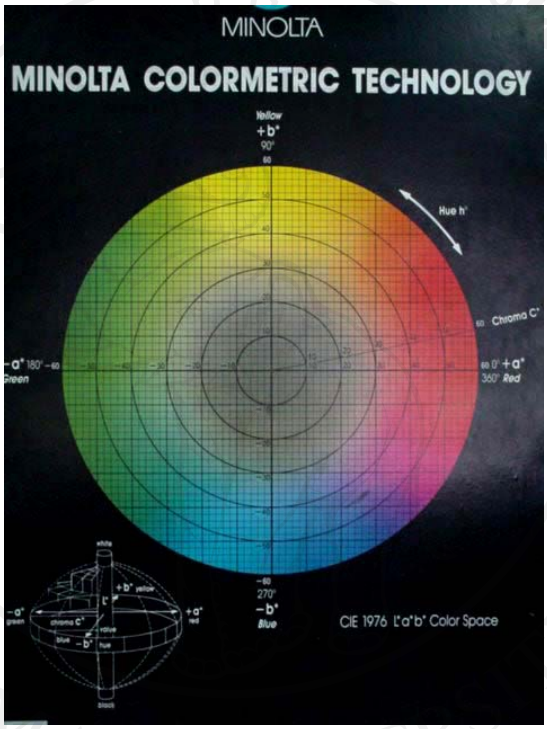
ค่า h° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง 180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน

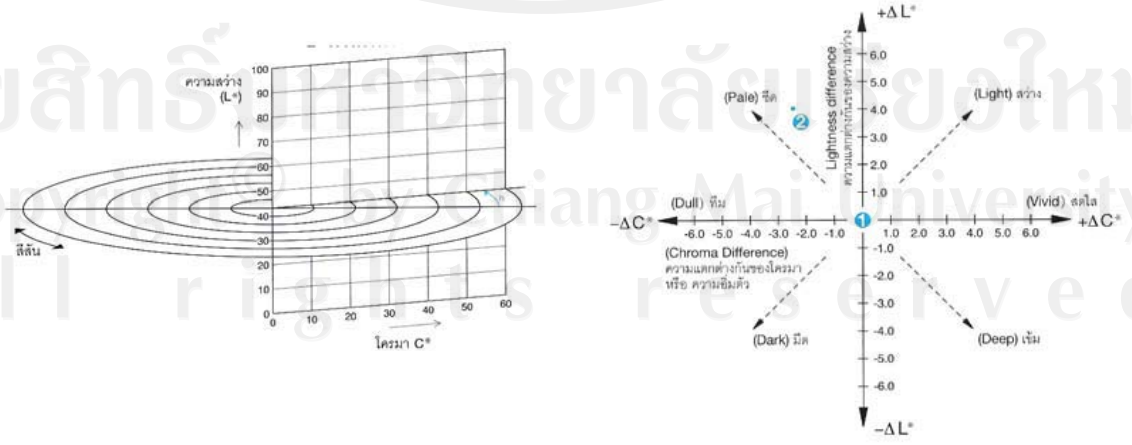
45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง 225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว 270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว 315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง



ภาพ 3 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็นค่า L*, a* และ b*



ภาพ 4 ค่าความอิ่มตัว (chroma) และความสว่าง (lightness) ของสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.20 ชั้นวางหลอดทดลอง

2.21 มีดทำครัว

2.22 เขียงพลาสติก

2.23 ช้อนตักสารเคมี

2.24 โกร่งบด

2.25 นาฬิกาจับเวลา (บริษัท CASIO, ประเทศญี่ปุ่น)

2.26 เครื่อง gas chromatography รุ่น GC-8A (บริษัท SHIMADZU, ประเทศญี่ปุ่น) โดยมีรายละเอียดดังนี้

- Detector: Thermal conductivity detector (TCD)
- Column: CTR-1 column (2 m x 6 mm o.d.) (Alltech, Deerfield, IL) และ Parapak Type N (80-100 Mesh) (SHIMADZU)
- Carrier gas: helium, 150 ml/min
- Oven terperature: 110 ° C
- Injection temperature: 110 ° C
- Column temperature: 65 ° C

2.27 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- กระบอกตวง (cylinder)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- หลอดหยด (dropper)
- บิวเรตต์ (burette)
- ปิเปตต์ (pipette)
- กรวยกรอง (funnel)
- แท่งแก้วคนสารละลาย (stirrer)
- จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
- หลอดทดลอง (test tube)

2.28 ถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู ขนาด 10x16 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 18 รู มีความหนาเท่ากับ 40 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.29 ถุงแอกทีฟ คือ ถุงพอลิเอทิลีนที่มีอัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน (OTR) 10,000-12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน มีค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (WVTR) เท่ากับ 5-7 กรัม/ตารางเมตร/วัน มีการผสมสาร anti-fogging agent เพื่อป้องกันการเกิดฝ้าไอน้ำ ถุงมีขนาด 10x16 เซนติเมตร และมีความหนา เท่ากับ 25 ไมครอน

3. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- สารละลายกรดออกซาลิก (Oxalic acid, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- สารละลาย 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2, 6-dichlorophenol indophenol, SIGMA) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (Ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.050 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิต่ำ

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- สารละลายอะซีโตน (acetone) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซีโตนมา 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ

- สารละลาย 2, 2 - ไดฟีนิล-2-ไพคลิไฮดราซิล (2, 2 - diphenyl-2-picryhydrazyl: DPPH) ชั่ง สารละลาย 2, 2 - ไดฟีนิล-2-ไพคลิไฮดราซิลมา 74 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล (ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์) ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วย nylon filter ขนาด 0.4 micron เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- สารละลายกรดแกลลิกมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิกมา 24.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานในการคำนวณหากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Merck) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- Folin-Ciocalteau' s phenol reagent, Merck

3.5 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส

3.5.1 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5

- สารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (*di*-potassium hydrogen phosphate, Merck) เตรียมโดยชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.927 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, Merck) ชั่งโพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 2.606 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

เติมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรด) ลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (ด่าง) จนได้ค่า pH เท่ากับ 7.5 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.5.2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 7.0

- สารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (*di*-potassium hydrogen phosphate, Merck) เตรียมโดยชั่งไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.344 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, Merck) ชั่งโพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 0.478 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

เติมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรด) ลงในสารละลายไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (ด่าง) จนได้ค่า pH เท่ากับ 7.0 เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.5.3 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride, Univar) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ 1.8638 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4 สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.24 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลาย Triton X-100 ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.5.5 สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 1.44 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใช้สารละลาย Triton X-100 ปริมาตร 0.72 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ให้ครบ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

3.5.6 อะซีโตน (acetone, Merck) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซีโตนความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.5.7 คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a from spinach, Sigma)

3.5.8 เฮกเซน (hexane, Unilab)

3.6 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.6.1 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS)

- สารละลายโซเดียมโฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต น้ำหนัก 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- สารละลายบัฟเฟอร์ ที่มี pH 7.5 เตรียมโดย นำสารละลายโซเดียมโฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตรมาปรับ pH ด้วยสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยค่อย ๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ลงในสารละลายโซเดียมโฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พร้อมกับคนสารละลายผสมตลอดเวลาจน pH ของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

- สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ น้ำหนัก 11.7467 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งโปรตีน bovine serum albumin (BSA) 0.2500 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร โดยการเติม PBS จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- สารละลาย coomassie เตรียมโดยชั่ง coomassie brilliant blue G-250 หนัก 0.0125 กรัม ละลายใน เอธานอล 99.5 % ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 % ลงไป 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.7 สารเคมีที่ใช้หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารละลายเจือจาง ตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งเปปโตน (peptone, Becton and Dickinson Company) มา 1 กรัม และมีเกลือแกง (sodium chloride, Becton and Dickinson Company) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งเกลือแกงมา 5 กรัม เติมลงในสารละลายเปปโตนผสมให้ละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดแก้วทนความร้อนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ในขวดแก้วทนความร้อน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่เตรียมได้ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ต่อสารละลาย 1 ลิตร ดังนี้

Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย

1. หน่วยวิจัยหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ได้มีการทดลองใช้ถุงแอกทีฟสูตร M_1 M_2 และ M_3 โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 3 ซ้ำ โดยแต่ละวิธีมีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 บรอกโคลีที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M_1
(อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 10,000 - 12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน)

กรรมวิธีที่ 2 บรอกโคลีที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M_2
(อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 12,000 – 14,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน)

กรรมวิธีที่ 3 บรอกโคลีที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M_3
(อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 10,000 - 11,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน)

วิธีการทดลอง นำบรอกโคลีที่ตัดแต่งพร้อมจำหน่ายแล้วบรรจุลงในถุงแอกทีฟ 3 สูตร คือ M_1, M_2 และ M_3 นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีทุกวันจนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา บันทึกผลการทดลอง 1. ลักษณะปรากฏ โดยการให้คะแนน 2. วัดการเปลี่ยนแปลงสีช่อดอก โดยใช้เครื่อง Chroma meter 3. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก 4. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้โดยเครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ 5. ปริมาณวิตามินซีรวมโดยวิธีของ Ranganna (1986) และ 6. อายุการเก็บรักษา โดยจากผลการทดลองจะใช้อายุการเก็บรักษาเป็นตัวตัดสินในการเลือกใช้ถุงในการทดลองต่อไป

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า บรอกโคลีที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M_1 (อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 10,000 - 12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน) มีอายุการเก็บรักษานานที่สุด คือ 14 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1 ผลของบรรจุภัณฑ์ต่อส่วนประกอบทางเคมีและอายุการวางจำหน่ายบรอกโคลี

วิเคราะห์ข้อมูลแบบ T-test มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย 4 ซ้ำ โดยกรรมวิธีมีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 บรอกโคลีที่บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู

กรรมวิธีที่ 2 บรอกโคลีที่บรรจุในถุงแอกทีฟ

วิธีการทดลอง

นำบรอกโคลีที่ตัดแต่งพร้อมจำหน่ายบรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรูและถุงแอกทีฟ (อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 10,000 - 12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน) แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีทุกวันจนกระทั่งผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา ทำการทดลอง 3 ครั้ง คือ ฤดูร้อน (มีนาคม-มิถุนายน), ฤดูฝน (กรกฎาคม-ตุลาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์)

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมี

1. ลักษณะปรากฏ บันทึกโดยการให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน 1 ช่อดอกสดและมีสีเขียว

ระดับคะแนน 2 ช่อดอกเริ่มเหี่ยวหรือมีสีเหลืองเกิดขึ้นเล็กน้อย

ระดับคะแนน 3 ช่อดอกเหี่ยวประมาณ 50% หรือสีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง 50% (หมดอายุการวางจำหน่าย)

ระดับคะแนน 4 ช่อดอกเหี่ยวประมาณ 75% หรือสีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง 75%

ระดับคะแนน 5 ช่อดอกเหี่ยว 100% หรือสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด

2. การเปลี่ยนสีช่อดอก

วัดโดยใช้เครื่อง Chroma meter รุ่น CR300 หัววัด CR310 ของบริษัท Minolta และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 โดยการวัดสีบริเวณกึ่งกลางช่อดอก วัด 4 ครั้ง/ 1 จุด ค่าที่ได้แสดงเป็น L*, a* และ b* คำนวณหาค่า chroma และ hue angle จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992 ; Voss, 1992)

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

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

วัดโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง EK-600H นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

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

4. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ; TSS)

โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท ATAGO อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์ โดยอ่านค่าจากน้ำคั้นของบรอกโคลีที่ปั่นรวมกัน

5. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในบรอกโคลีด้วยวิธี Indophenol โดยนำบรอกโคลีที่ปั่นได้มา 10 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จนครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติซึ่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูประมาณ 15 วินาที บันทึกปริมาณ 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณวิตามินซี โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1986)

ปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตร	มี ascorbic acid	เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)
ปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตร	มี ascorbic acid	เท่ากับ (1 × b)/a มิลลิกรัม
(จากสารละลายตัวอย่าง)		เท่ากับ c มิลลิกรัม
สารละลาย 10 มิลลิลิตร	มี ascorbic acid	เท่ากับ c มิลลิกรัม
สารละลาย 100 มิลลิลิตร	มี ascorbic acid	เท่ากับ (c × 100)/10 มิลลิกรัม
		เท่ากับ d มิลลิกรัม
เนื้อตัวอย่าง 10 กรัม	มี ascorbic acid	เท่ากับ d มิลลิกรัม
เนื้อตัวอย่าง 100 กรัม	มี ascorbic acid	เท่ากับ (d × 100)/10 มิลลิกรัม
		เท่ากับ e มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ปริมาณคลอโรฟิลล์

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Whitham *et al.* (1971) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ชั่งตัวอย่างปั่นละเอียดมา 1 กรัม

↓

เติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

↓

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

↓

ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น 25 มิลลิลิตร

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร

นำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

Chlorophyll a = [12.7 (Absorbance at 663 nm) – 2.69(Absorbance at 645 nm)] x (V/1000W)

Chlorophyll b = [22.9 (Absorbance at 645 nm) – 4.68(Absorbance at 663 nm)] x (V/1000W)

Chlorophyll = [20.2 (Absorbance at 645 nm) + 8.02(Absorbance at 663 nm)] x (V/1000W)

กำหนดให้ V = ปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย

W = น้ำหนักของตัวอย่างพืชที่นำมาหาคลอโรฟิลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ปริมาณแคโรทีนอยด์

วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมตามวิธีการของ Pawelzik (2006) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ชั่งตัวอย่างผักที่สับละเอียดมา 1 กรัม

↓

แช่ตัวอย่างผักใน dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓

คนตัวอย่างพืชด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 16 ชั่วโมง

↓

กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4

↓

วัดค่าดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร

นำค่า OD ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักตัวอย่างสด โดยสูตรที่ใช้คำนวณคือ

Chlorophyll a = [(12.19 x Absorbance at 665) – (3.45 x Absorbance at 649)] mg/gFW

Chlorophyll b = [(21.99 x Absorbance at 649) – (5.32 x Absorbance at 665)] mg/gFW

Total Chlorophyll = Chlorophyll a + b

$$\text{Total carotenoid} = \frac{[(1000 \times \text{Absorbance at } 480) - (2.14 \times \text{chlorophyll a}) - (70.16 \times \text{chlorophyll b})]}{220}$$

8. ปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ Gas chromatography

วัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สออกซิเจน โดยใช้เครื่อง gas chromatography รุ่น GC-8A ของบริษัท SHIMADZU โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เสียบเข้าถุงตัวอย่างดูดอากาศออกมา 1 มิลลิลิตร และนำมาฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography ที่ Injector port ซึ่งมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผ่านเข้าเครื่อง Packed column มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงนอก 0.32 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางวงใน 0.21 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร ซึ่งบรรจุสาร Porapak R

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิของเตาอบ 60 องศาเซลเซียส โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็น Carrier gas อัตราการไหล 40 มิลลิลิตร ต่อนาที และใช้ Thermal conductivity detector ที่มีอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ซึ่งอ่านค่าออกมาเป็นปริมาณของแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

9. กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

โดย 2, 2′-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay (DPPH assay) หากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระตามกระบวนการดัดแปลงมาจาก Manthey (2004) ซึ่ง มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

หั่นผักให้ละเอียด เติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักแข็งตัว

↓

ปั่นตัวอย่างที่แข็งให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ

↓

ชั่งตัวอย่างละเอียด 20 กรัม เติมสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงไป

↓

เขย่าสารละลายที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓

กรองโดยกระดาษกรอง Whatman No.1 และดูดสารสกัดจากพืชที่กรองได้
ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร โดยสารละลายเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์

↓

กรองสารละลายด้วย 0.45 µm syringe nylon filter

↓

นำสารสกัดที่กรองด้วย 0.45 µm syringe nylon filter 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก

↓

เติมสารละลาย DPPH ลงไป 2000 ไมโครลิตร

↓

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
ใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็นค่ามาตรฐาน (Blank)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่า OD ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

10. ปริมาณสารประกอบฟีนอล

หาปริมาณสารประกอบฟีนอล ตามกระบวนการดัดแปลงมาจาก Sellappan *et al.* (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วย syringe hylon filter 0.45 µm ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

↓

ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

↓

เติมเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

↓

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 375 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ประมาณ 5 นาที

↓

เติม Folin-Ciocalteau solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ร่วมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 2 ชั่วโมง

↓

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์

↓

วัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็นค่ามาตรฐาน (Blank)

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส (chlorophyllase)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Amir-Shapira *et al.* (1987)

1) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลส มีวิธีการดังต่อไปนี้

บรอกโคลี บดละเอียด 5 กรัม

↓

สกัดด้วยสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เย็นจัด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

↓

ล้างกากตัวอย่างด้วย diethyl ether เย็นจัดจนกระทั่งได้กากสีขาว

↓

ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำไปบดละเอียดให้อยู่ในรูป acetone powder

↓

สกัด acetone powder 0.5 กรัม ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100)

↓

คนให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง

↓

กรองด้วย Miracloth

↓

นำไปตกตะกอนที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้ คือ crude enzyme

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

โดยนำ crude enzyme ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ละลายพร้อมกับ Triton X-100 ความเข้มข้น 1.44 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร Chlorophyll a acetone solution ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml ของสารละลายอะซีโตนปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 M Phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath 25 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย acetone 2 มิลลิลิตร และเติม hexane 2 มิลลิลิตร เพื่อสกัดคลอโรฟิลเลสที่ไม่สลายตัว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 663 nm เปรียบเทียบกับ blank ที่ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร, acetone 1 มิลลิลิตร, chlorophyll a (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำมาผสมให้เข้ากันแล้วดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างเอนไซม์คลอโรฟิลเลสที่สกัดไว้ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็นหน่วยมิลลิกรัมโปรตีน (1 unit เท่ากับการเปลี่ยนแปลงอัตราค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.01 ต่อนาที) โดยตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976) ดังต่อไปนี้

ดูด crude enzyme มา 250 ไมโครลิตร
แล้วเติม 0.1 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

↓

สารละลายที่ได้ คือ crude enzyme solution

↓

ดูด crude enzyme solution มา 300 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลาย coomassie brilliant blue ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร

↓

วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

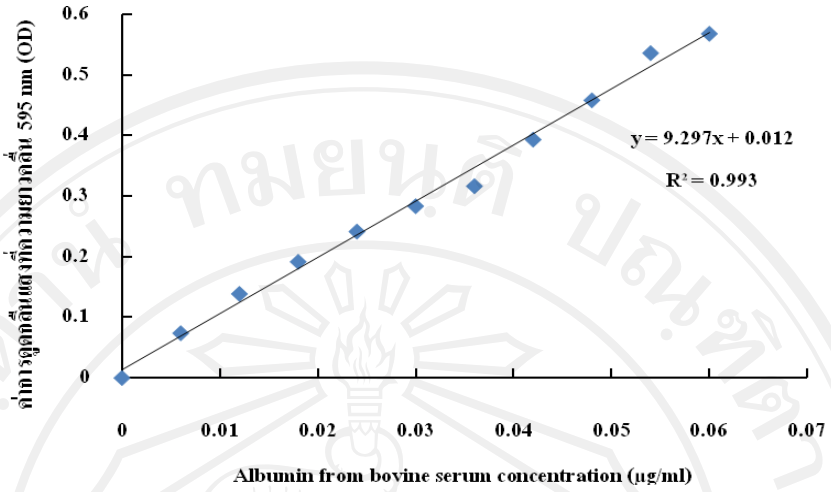
↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

↓

คำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน
มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน (albumin from bovine serum)

11. อายุการเก็บรักษา

กำหนดให้ผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษาเมื่อมีคะแนนการประเมินด้านลักษณะปรากฏเท่ากับ 3 หรือมากกว่า

การทดลองที่ 2 คุณภาพทางกายภาพและเคมีของบรอกโคลีหั่นชิ้นพร้อมปรุง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) จำนวน 4 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 บรรจุภัณฑ์ ประกอบด้วยบรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรูและ บรรจุในถุงแอกทีฟ (อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน 10,000 - 12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร/วัน)

ปัจจัยที่ 2 น้ำหนักที่บรรจุ ประกอบด้วย 200, 400 และ 600 กรัม

วิธีการทดลอง

นำบรอกโคลีมาหั่นชิ้นให้มีขนาด 2 x 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำบรอกโคลีพร้อมปรุงจุ่มลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 นาที เพื่อกำจัดจุลินทรีย์และสิ่งสกปรก แล้วทำให้สะเด็ดน้ำ บรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรูน้ำหนัก 200, 400 และ 600 กรัม เปรียบเทียบกับบรอกโคลีที่บรรจุลงในถุงแอกทีฟ นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีทุกวันจนผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คุณภาพทางเคมีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยประเมินการเกิดกลิ่นผิดปกติ และหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มเติม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. การเกิดกลิ่นผิดปกติ บันทึกโดยการให้คะแนนการเกิดกลิ่นผิดปกติตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน 1 ไม่เกิดกลิ่นผิดปกติ

ระดับคะแนน 2 เกิดกลิ่นผิดปกติ

2. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ Enterobacteriaceae ตามวิธีการของ Kiss (1984)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างบรอกโคลีหั่นชิ้น 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน จำนวน 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างบรอกโคลีที่มีความเจือจางเป็น 2×10^{-1} ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างข้างต้น ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ เปปโตนอยู่แล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายตัวอย่างบรอกโคลีที่มีความเจือจาง 2×10^{-2} ทำการเจือจางตัวอย่างบรอกโคลีต่อไป ตามวิธีการข้างต้น จนได้สารละลายตัวอย่างบรอกโคลีพร้อมปรุงที่มีความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ 2×10^{-4} ถึง 2×10^{-7})

การใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างบรอกโคลีที่มีความเจือจางระดับต่าง ๆ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยสารละลายตัวอย่างแต่ละระดับความเข้มข้น ทำ 4 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่หลอมเหลวประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างบรอกโคลีอยู่ ผสมสารละลายตัวอย่างบรอกโคลีและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วปิดผนึกรอบด้วยพาราฟิล์ม สำหรับชุดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างบรอกโคลี นำจานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 24±3 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ จำนวนโคโลนี/กรัมน้ำหนักสด (log CFU/g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าแสดงความผิดพลาด (mean±S.E.) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 17.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved