บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุพันธุ์พืช

ผักกาดหอมห่อพันธุ์ เฟลม (Flame) ซึ่งเก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้าจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ บรรจุตะกร้าพลาสติกรองด้วยกระดาษบรู๊ฟสีขาว แล้วขนส่งมาโดยรถบรรทุกธรรมดาของมูลนิธิโครงการหลวงมาที่ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวงเชียงใหม่ นำส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรถขนส่งของมูลนิธิโครงการหลวง แล้วนำมาทดลองทันที

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

2.1 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น EK-600H ของบริษัท AND Company ประเทศญี่ปุ่น ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200H ของบริษัท AND Company ประเทศญี่ปุ่น ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

2.2 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น อ่านค่าได้ในช่วง 0-45 เปอร์เซ็นต์

2.3 เครื่องปั่นผลไม้ (blender) รุ่น S(643) ของบริษัท Moulinex ประเทศสเปน

2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) รุ่น CG842 ของบริษัท SCHOTT GLAS Mainz ประเทศเยอรมัน

2.5 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน รุ่น SP-18420-26 ของบริษัท Nuova II ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.6 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงรุ่น GENESYS 10UV scanning ของบริษัท Ken Qauty ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.7 เครื่อง centrifuge รุ่น Z383K ของบริษัท HERMLE หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุดที่ 15,000 รอบต่อนาที หรือ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงปรับอุณหภูมิต่ำ (High refrigerate speed centrifuge and accessories) รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, ประเทศเยอรมัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8 เครื่องวัดสี (Chroma meter) รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น หัววัด รุ่น CR-310 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ (ภาพที่ 1 และ 2)

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- มีความสว่างมากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

a*,b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ค่า a* และ b* มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma - มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)

- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

คำนวณหาค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี (McGuire, 1992)

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

ถ้า a > 0 และ b > 0 ; ค่า h^{o} = THETA

ถ้า a < 0 และ b < 0 ; ค่า h^{o} = THETA + 180

ถ้า a < 0 และ b > 0 ; ค่า h^{o} = THETA + 180

ถ้า a > 0 และ b < 0 ; ค่า h^{o} = THETA + 360

ค่า h^{o} เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

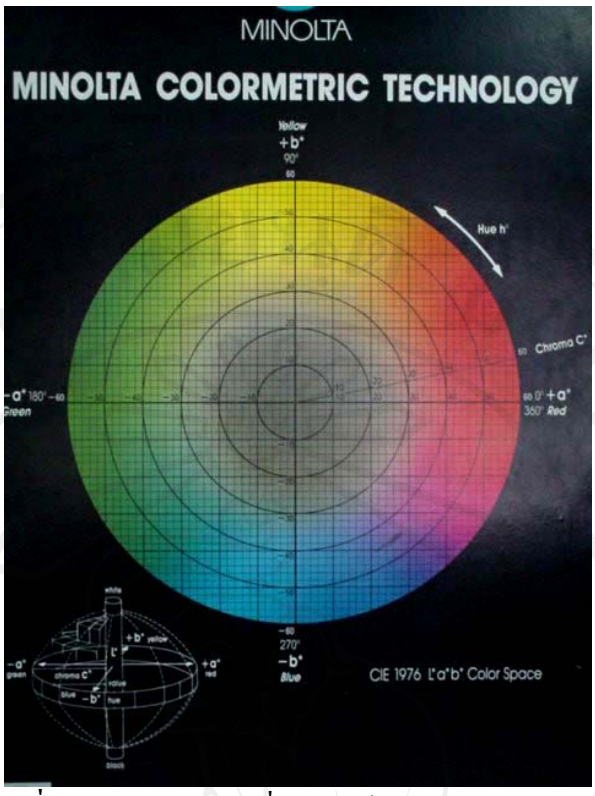
0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง 180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน

45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง 225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

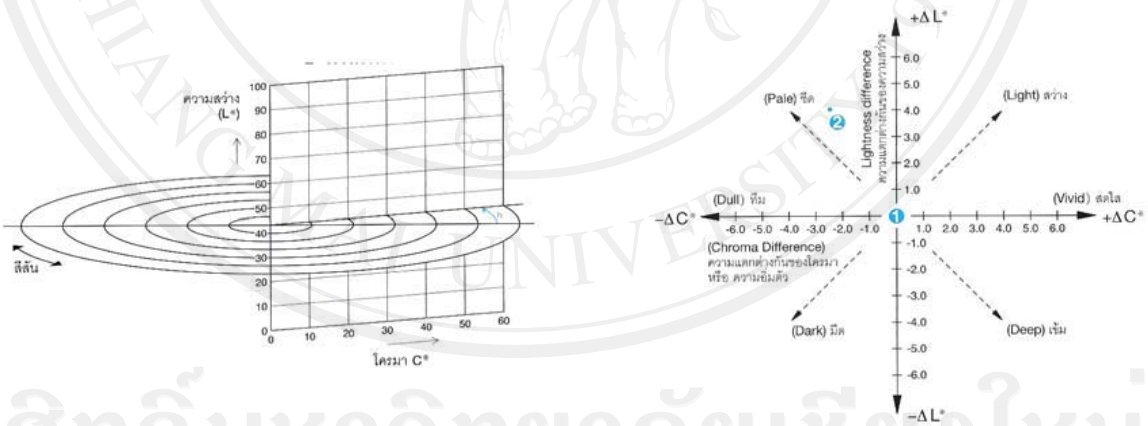
90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว 270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว 315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็นค่า L*, a* และ b*



ภาพที่ 3 ค่าความอิ่มตัว (chroma) และความสว่าง (lightness) ของสี

2.9 เครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ (coffee blender) รุ่น CG-100 ของบริษัท KENWOOD ประเทศอังกฤษ

2.10 เครื่องเหวี่ยงแยกส่วนเกินออกจากผิวนอกของชิ้นผัก (Press to spin, Salad spinner, Capacity 5.6 Ltrs, Thailand)

2.11 Micropipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร รุ่น M20813J ของบริษัท GILSON ประเทศฝรั่งเศส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.12 กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร ของบริษัท Whatman International ประเทศอังกฤษ

2.13 เครื่อง Vortex-Genie 2 รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.14 ตู้เย็นอุณหภูมิ 0, 4 และ 8 องศาเซลเซียส รุ่น LC203LD ของบริษัท LAW-CHAIN ประเทศไทย

2.15 หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HL-300 ของบริษัท Memmert

2.16 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น AS1324 ของบริษัท Standards Australia

2.17 กล้องถ่ายรูปรุ่น Cyber-shot DSC-T5 ของบริษัท SONY ประเทศญี่ปุ่น

2.18 ตู้อบไมโครเวฟ (microwave) รุ่น EMO-900T ของบริษัท Sanyo

2.19 Syring ขนาด 100 ไมโครลิตร ของบริษัท Hamilton ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.20 นาฬิกาจับเวลา ของบริษัท CASIO

2.21 เขียงพลาสติก

2.22 Oven

2.23 มีดทำครัว

2.24 ชั้นวางหลอดทดลอง

2.25 ตู้ UV

2.26 เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-8A ของบริษัท SHIMADZU ประเทศญี่ปุ่น โดยมีรายละเอียดดังนี้

- Detector : Thermal conductivity detector (TCD)

-Column : Molecular Sieve 5A 80/100 ท่อสแตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร อุณหภูมิสูงสุด 350 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์แก๊สออกซิเจน และ Parapak Type N80/100 ท่อสแตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 1 เมตร อุณหภูมิสูงสุด 190 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

- Injection temperature : 110 องศาเซลเซียส

- Column temperature : 70 องศาเซลเซียส

- Oven temperature : 110 องศาเซลเซียส

- Carrier gas : แก๊สฮีเลียม (Helium gas) มีอัตราการไหล 25 มิลลิลิตร/นาที

- Standard gas : แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และแก๊สออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ในแก๊สไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.27 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- กระบอกตวง (cylinder)
- บิวเรตต์ (burette)
- ปิเปตต์ (pipette)
- หลอดหยด (dropper)
- แท่งแก้วคนสารละลาย (stirrer)
- กรวยกรอง
- ช้อนตักสารเคมี
- หลอดทดลอง
- โกร่งบด
- จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
- หลอดแก้วฝาเกลียวทนความร้อน

2.28 เทอร์โมมิเตอร์

2.29 เครื่องเขย่า

2.30 ผ้าขาวบาง

2.31 ลูกยางดูดอากาศ

2.32 nylon syringe filter

2.33 กล่องครอบปฏิกิริยาในที่มืด

2.34 hygrometer

2.35 ถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู ขนาด 10x16 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 18 รู มีความหนา เท่ากับ 40 ไมครอน

2.36 ถุงแอกทีฟ คือ ถุงพอลิเอทิลีนที่มีอัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน(OTR) เท่ากับ 10,000-12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร-วัน มีค่าการซึมผ่านของไอน้ำ(WVTR) เท่ากับ 5-7 กรัม/ตารางเมตร-วัน มีการผสมสาร Anti-fogging Agent เพื่อป้องกันการเกิดฝ้าไอน้ำ มีขนาด 10x16 เซนติเมตร และ มีความหนา เท่ากับ 25 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์

- สารละลายอะซีโตน (acetone) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซีโตนมา 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (Oxalic acid : $C_2H_2O_4.2H_2O$, เกรดAR ของบริษัท Ajax Chemicals ประเทศออสเตรเลีย) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 2,6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล (2,6-Dichlorophenol-indophenol : $C_{12}H_6Cl_2NO_2Na$, เกรด AR ของบริษัท SIGMA Chemicals ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง What man No.1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (L-Ascorbic acid : $C_6H_8O_6$, เกรด GR ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน) เตรียมโดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร ปิเปตต์มา 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ (สารละลายเป็นสีชมพู) แล้วบันทึกปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล-อินโดฟีนอล ที่ใช้ไปโดยทำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

3.3 สารเคมีที่ใช้หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารละลายเจือจาง ตัวอย่างเตรียมโดยชั่งเปปโตน (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 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใส่ในขวดแก้วทนความร้อน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่เตรียมได้ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ต่อสารละลาย 1 ลิตร ดังนี้

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

3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Jiang (1999) และ Tian *et al*. (2002)

การเตรียมสารละลาย

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8

เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ของบริษัท (Merck) (reagent grade Scharlau, Spain) น้ำหนัก 15.6010 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.2H_2O$) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ของบริษัท (Merck) (reagent grade Scharlau, Spain) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.8 โดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 735 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 265 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายผสมให้ได้เท่ากับ 6.8

- สารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โดยชั่ง catechol ของบริษัท (Merck) น้ำหนัก 5.5050 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 สารเคมีที่ใช้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

การเตรียมสารละลาย

สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ Phosphate Buffer Saline (PBS)

ก. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต ของบริษัท (Merck) น้ำหนัก 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ของบริษัท(Merck) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.5

เตรียมโดย นำสารละลายในข้อ ก. 100 มิลลิลิตรมาปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย ข. โดยค่อย ๆ เติมสารละลายในข้อ ข. ลงในสารละลาย ก. พร้อมกับคนสารละลายผสมตลอดเวลา จนความเป็นกรด-ด่างของสารละลายผสมเท่ากับ 7.5

ง. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ ของบริษัท (Merck) น้ำหนัก 11.7467 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

จ. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ หรือ phosphate buffer saline (PBS)

เตรียมโดยนำสารละลายบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 7.5 (สารในข้อ ค.) มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ (สารในข้อ ง.) ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford Protein Assay (1976)

การเตรียมสารละลาย

ก. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) 0.2500 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25.00 มิลลิลิตร โดยการเติม PBS จะได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. สารละลาย Coomassie

ชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 หนัก 0.0125 กรัม ละลายใน เอทานอล 99.5 % ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 % ลงไป 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 250.00 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

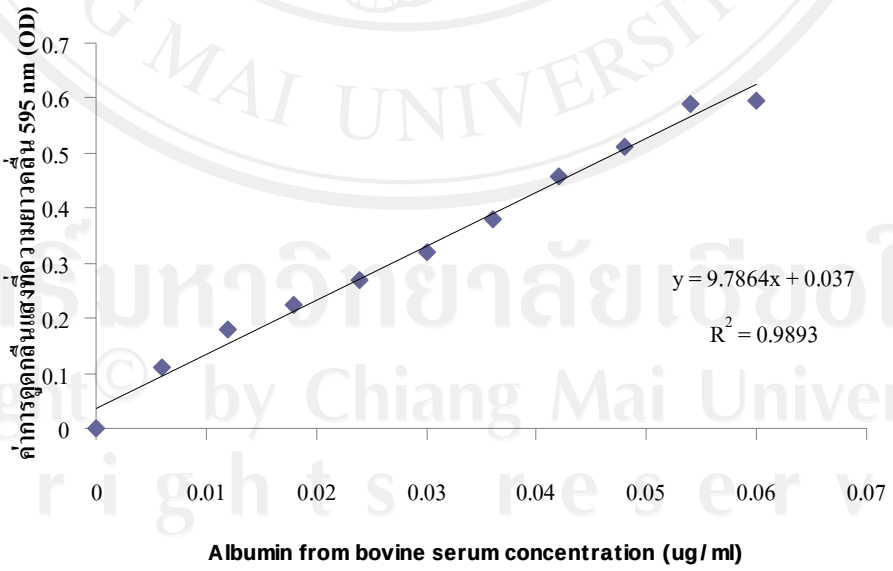
วิธีทดลอง

ก. การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโปรตีน 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 และ 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดให้ปริมาตรรวมของสารละลายในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร ด้วย PBS จากนั้นเติมสารละลาย Coomassie ลงไปหลอดละ 3.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันตั้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง

ข. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายตัวอย่างเจือจางจนเหมาะสมด้วย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ผสมและตั้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน (Albumin from bovine serum)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้ได้มีการทดลองเพื่อเลือกถุงแอกทีฟ ที่มีความเหมาะสมกับการเก็บรักษาผักกาดหอมห่อที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 3 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M1 มีค่า OTR เท่ากับ 10,000-12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร-วัน

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M2 มีค่า OTR เท่ากับ 12,000-14,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร-วัน

กรรมวิธีที่ 3 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ สูตร M3 มีค่า OTR เท่ากับ 10,000-11,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร-วัน

วิธีการทดลอง ผักกาดหอมห่อที่ตัดแต่งพร้อมจำหน่ายแล้วบรรจุลงในถุงแอกทีฟ 3 สูตร คือ M1, M2 และ M3 นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและส่วนประกอบทางเคมีทุกวันจนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

1. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนน
   - สีใบความสด
   - ความเหี่ยวของใบ
   - การเกิดสีน้ำตาล
   - ความกรอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การเกิดกลิ่นผิดปกติ
- บาดแผล/การเกิดโรค
- คุณภาพโดยรวม

2. สี โดยใช้เครื่อง Chroma meter

3. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

4. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

5. ปริมาณวิตามินซีรวมโดยวิธีของ Ranganna (1986) ไทเทรชันด้วยสารละลาย2,6-dichlorophenol-indolephenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลอง พบว่า ถุงแอกทีฟ สูตร M1 มีค่า OTR เท่ากับ 10,000-12,000 มิลลิลิตร/ตารางเมตร-วัน มีความเหมาะสมกับการเก็บรักษาผักกาดหอมห่อที่สุด จึงได้นำมาใช้ในการทดลองต่อไป ดังนี้

การทดลองที่ 1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของผักกาดหอมห่อที่เก็บรักษาในถุงแอกทีฟและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

วางแผนการทดลอง แบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของถุง 2 ชนิด คือ ถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู และถุงแอกทีฟ

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิในการเก็บรักษา 4 ระดับ คือ 0, 4, 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ซึ่งแต่ละวิธีการประกอบด้วย 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำ คือ ผักกาดหอมห่อ 1 หัว และทำการทดลอง 3 ครั้ง คือ ฤดูร้อน (มีนาคม-เมษายน) ฤดูฝน (กรกฎาคม-สิงหาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม)

วิธีการทดลอง

ผักกาดหอมห่อพันธุ์ เฟลม (Flame) ซึ่งเก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้าจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ มาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ ตัดแต่งเอาใบที่ถูกทำลายจากโรคและแมลงหรือชอกช้ำออกทิ้งประมาณ 4-5ใบนำผักกาดหอมห่อบรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะ-รู และถุงแอกทีฟ หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4, 8 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมีทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

1. ลักษณะปรากฏ โดยการให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนนเท่ากับ 1 คือใบมีความสด 81-100 เปอร์เซ็นต์ (ใบมีสีเขียวและสด)

ระดับคะแนนเท่ากับ 2 คือใบมีความสด 61-80 เปอร์เซ็นต์
(ใบเริ่มเหี่ยว และเริ่มมีสีเหลืองเล็กน้อย)

ระดับคะแนนเท่ากับ 3 คือใบมีความสด 41-60 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวมีสีเหลือง หมดอายุการเก็บรักษา)

ระดับคะแนนเท่ากับ 4 คือใบมีความสด 21-40 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวมาก มีสีเหลือง)

ระดับคะแนนเท่ากับ 5 คือใบมีความสด 0-20 เปอร์เซ็นต์
(ใบเหี่ยวมาก มีสีเหลือง มีรอยช้ำ และเน่า)

2. สี

โดยใช้เครื่องวัดสี Chromameter รุ่น CR-300 หัววัด CR-310 ของบริษัท Minolta และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 โดยการวัด 1 ตำแหน่ง คือ แผ่นใบ ค่าที่ได้แสดงเป็น L*, a*, b* คำนวณหาค่า chroma และ hue angle จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992 ; Voss, 1992)

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

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

3. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง EK-600H นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักภายหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

การประเมินคุณภาพทางเคมี

1. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักกาดหอมห่อด้วยวิธี Indophenol โดยนำผักกาดหอมห่อที่ปั่นได้มา 10 กรัม แล้วเติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้มา1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2, 6-dichlorophenolindolephenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จุดยุติซึ่งสารละลายมีสีชมพูประมาณ 15 วินาที แล้วคำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาณ 2, 6-dichlorophenolindolephenol ที่ใช้กับสารตัวอย่าง เทียบกับ 2, 6- dichlorophenolindolephenol ที่ใช้กับวิตามินซีมาตรฐาน โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1986)

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

2. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ; TSS)

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

3. ปริมาณคลอโรฟิลล์โดยวิธีของ Whitham *et al.*,(1971)

หั่นผักกาดหอมห่อให้ละเอียดเติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักกาดหอมห่อแข็งตัวปั่นตัวอย่างที่แข็งให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นชั่งตัวอย่างละเอียดมา 1 กรัม เติมสารละลายอะซีโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาทีแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซีโตนให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 15 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้สารละลายอะซีโตนความเข้มข้น80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ} = [12.7(OD_{663})-2.69\,(OD_{645})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี} = [22.9(OD_{645}) - 4.68(OD_{663})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = [20.2\,(OD_{645}) + 8.02\,(OD_{663})] \times \frac{V}{1{,}000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของผักกาดหอมห่อที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

4. ปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

วัดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สออกซิเจน โดยใช้เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-8A ของบริษัท SHIMADZU โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร เสียบเข้าถุงตัวอย่าง ดูดอากาศออกมา 1 มิลลิลิตร และนำมาฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography ที่ Injector port ซึ่งมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผ่านเข้า Packed column มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงนอก 0.32 เซนติเมตรเส้นผ่านศูนย์กลางวงใน 0.21 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร ซึ่งบรรจุสาร Porapak R อุณหภูมิของ Oven 60 องศาเซลเซียส โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็น Carrier gas อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ Thermal conductivity detector ที่มีอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ซึ่งอ่านค่าออกมาเป็นปริมาณของแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

5. ปริมาณสารประกอบฟีนอล

โดยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric assays (Sellappan *et.al.,* 2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วย syringe hylon filter 0.45 µm ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

↓

ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก

↓

เติม methanol 100 % ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

↓

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

เติมโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % ปริมาตร 375 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ประมาณ 5 นาที

↓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติม Folin-Ciocalteau solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตรร่วมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

↓

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 2 ชั่วโมง

↓

วัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

ใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากพืชเป็นค่ามาตรฐาน (blank) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยเทียบเป็นหน่วยไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม(Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

6. หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผักกาดหอมห่อ

กำหนดให้ใบผักกาดหอมห่อหมดอายุการเก็บรักษาเมื่อมีลักษณะปรากฏที่ระดับคะแนนเท่ากับ 3 คะแนนขึ้นไป ซึ่งผักกาดหอมห่อมีความสดอยู่ระหว่าง 41-60 เปอร์เซ็นต์ (ใบเหี่ยวและมีสีเหลือง)

การทดลองที่ 2 คุณภาพผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงที่บรรจุในถุงแอกทีฟ

วางแผนการทดลอง แบบ t-test มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงน้ำหนัก 50 กรัม โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง คือ ฤดูร้อน (พฤษภาคม) ฤดูฝน (กันยายน) และฤดูหนาว (ธันวาคม)

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ

วิธีการทดลอง

ผักกาดหอมห่อ พันธุ์ เฟลม (Flame) ซึ่งเก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้าจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ มาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ ตัดแต่งเอาใบที่ถูกทำลายด้วยโรคและแมลงหรือชอกช้ำออกทิ้งประมาณ 4-5 ใบนำมาหั่นชิ้นตามความยาวของก้านใบขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร และแยกเอาส่วนที่เป็นใจกลางผักออกทิ้ง ใส่ลงตะกร้าพลาสติกที่มีรูจุ่มลงในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้านส่วน นาน 30 วินาที นำมาทำให้สะเด็ดน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยเครื่องปั่น Spinner สำหรับผักใบหลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุง 50 กรัม บรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรูและถุงแอกทีฟ หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ทำการตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและเคมี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 บันทึกผลทุกวัน และตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total microbial count) ตามวิธีของ Kiss (1984) รายงานผลในรูป $\log_{10}$จำนวนโคโลนี/กรัมน้ำหนักสด (log CFU/g) จนหมดอายุการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

นำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนสี เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยบันทึกผลทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Kader *et al.* (1973)

1. การเกิดสีน้ำตาลที่รอยตัด ประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 5 คน และกำหนดคะแนนการเกิดสีน้ำตาล ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ ไม่เกิดสีน้ำตาล ถึงเกิดสีน้ำตาล 20 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 2 คือ เกิดสีน้ำตาลเล็กน้อย หมายถึง มีสีเหลืองอ่อน คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 20-40 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 คือ เกิดสีน้ำตาลปานกลาง หมายถึง มีสีน้ำตาลปนเหลือง คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 คือ เกิดสีน้ำตาลมาก หมายถึง มีสีสนิมปนน้ำตาล คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 60-80 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 5 คือ เกิดสีน้ำตาลมากที่สุด หมายถึง มีสีสนิมเข้มปนน้ำตาล คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

2. การเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-odor) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ ทดสอบประจำ 5 คน และกำหนดคะแนนการเกิดกลิ่นผิดปกติ ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ ไม่เกิดกลิ่นผิดปกติ

ระดับที่ 2 คือ เกิดกลิ่นผิดปกติ

3. การสูญเสียความกรอบ (crispness) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 5 คน และกำหนดคะแนนการสูญเสียความกรอบ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระดับที่ 1 คือ ผักมีลักษณะกรอบ

ระดับที่ 2 คือ ผักมีลักษณะเหี่ยวเล็กน้อย 20-40 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 คือ ผักมีลักษณะเหี่ยวปานกลาง 40-60 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 คือ ผักมีลักษณะเหี่ยวมาก 60-80 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 5 คือ ผักมีลักษณะเหี่ยวมากที่สุด มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

4. คุณภาพการยอมรับโดยรวม (overall quality) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 5 คน และกำหนดคะแนนของคุณภาพการยอมรับโดยรวม ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ พอใจมากที่สุด

ระดับที่ 2 คือ พอใจมาก

ระดับที่ 3 คือ พอใจ

ระดับที่ 4 คือ ไม่พอใจ

ระดับที่ 5 คือ ไม่พอใจมาก

หมายเหตุ เมื่อผู้ทดสอบให้คะแนนในระดับที่ 3 หรือมากกว่าใช้ตัดสินว่าคุณภาพของผักกาดหอมห่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

การประเมินคุณภาพทางเคมี

นำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี คือ ปริมาณวิตามินซี ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยใช้วิธีการวิเคราะห์เหมือนกับการทดลองที่ 1 บันทึกผลทุกวัน จนหมดอายุการเก็บรักษา

หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุง

กำหนดให้ผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงหมดอายุการเก็บรักษา เมื่อทำการประเมินคุณภาพการยอมรับโดยรวม (overall quality) โดยที่ผู้ทดสอบให้คะแนนในระดับที่ 3 หรือมากกว่าตัดสินว่าคุณภาพของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุงสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (total microbial count) ตามวิธีการของ Kiss (1984)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นประมาณ 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนจำนวน 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่เจือจาง 2×10^{-1} ใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างข้างต้นใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนอยู่แล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่เจือจาง 2×10^{-2} ทำการเจือจางตัวอย่างผักกาดหอมห่อ ต่อไป ตามวิธีการข้างต้นจนได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นที่มีความเจือจางเหมาะสม (ประมาณ 2×10^{-4} ถึง 2×10^{-7})

การใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่มีความเจือจางระดับต่างๆ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยสารละลายตัวอย่างแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่หลอมเหลวประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อ ผสมสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วปิดผนึกรอบด้วยพาราฟิล์ม สำหรับชุดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อ นำจานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนี บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ จำนวนโคโลนี / กรัมน้ำหนักสด (log CFU/g)

การทดลองที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

การทดลองที่ 3.1 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของผักกาดหอมห่อทั้งหัว

วางแผนการทดลอง แบบ t-test มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผักกาดหอมห่อจำนวน 1 หัว โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง คือ ฤดูร้อน (มีนาคม-เมษายน) ฤดูฝน (กรกฎาคม-สิงหาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-ธันวาคม)

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

ผักกาดหอมห่อ พันธุ์ เฟลม (Flame) ซึ่งเก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้าจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ มาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ ตัดแต่งเอาใบที่ถูกทำลายจากโรคและแมลงหรือช้ำออกนำผักกาดหอมห่อบรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู และถุงแอกทีฟ เก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 วัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา

การทดลองที่ 3.2 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุง
วางแผนการทดลองแบบ t-test มี 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุง 50 กรัม ทำการทดลอง 3 ครั้งคือ ฤดูร้อน (พฤษภาคม) ฤดูฝน (กันยายน) และฤดูหนาว (ธันวาคม)

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อที่บรรจุในถุงแอกทีฟ

วิธีการทดลอง

ผักกาดหอมห่อ พันธุ์ เฟลม (Flame) ซึ่งเก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้าจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ นำมาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ ตัดแต่งเอาใบที่ถูกทำลายจากโรคและแมลงหรือช้ำออกทิ้งประมาณ 4-5 ใบนำมาหั่นชิ้นตามความยาวของก้านใบขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร และแยกเอาส่วนที่เป็นใจกลางผักออกทิ้ง ใส่ลงตะกร้าพลาสติกที่มีรูจุ่มลงในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้านส่วนนาน 30 วินาที นำมาทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องปั่น Spinner สำหรับผักใบหลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นพร้อมปรุง 50 กรัม บรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรูและถุงแอกทีฟ หลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 วัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา

การบันทึกผลการทดลอง

วัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Jiang (1999) และ Tian *et al*. (2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ (enzyme extraction)

สกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำผักกาดหอมห่อหั่นให้ละเอียดแล้วใส่ไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักแข็งตัวนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเมล็ดกาแฟจากนั้นชั่งตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่ปั่นละเอียดมาจำนวน 3 กรัม แล้วบดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น เติมสารละลายสกัด (extraction solution) ในอัตราส่วนปริมาตรสารละลายสกัดต่อน้ำหนักผักกาดหอมห่อ เท่ากับ 8 : 1 ซึ่งสารสกัดนี้ประกอบไปด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8 และ Polyvinylpyrrolidone (PVPP) 1 เปอร์เซ็นต์ บดให้เข้ากันอีกครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, Germany) ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) โดยปิเปตสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette tube ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ (unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์โดยการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร 0.001 หน่วยต่อนาที แล้วคำนวณเป็น Specific activity ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณหน่วยเอนไซม์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved