บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบผลของสารถนอมอาหารบางชนิด ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากก้านช่อผลลำไยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมน้ำปั่นก้านช่อผลลำไยเข้มข้น 20% โดยนำกิ่งลำไยบริเวณช่อผลมาตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนัก 40 กรัม แบ่งเป็น 2 ส่วน นำแต่ละส่วนปั่นรวมกับอาหารเหลวสองชนิด ได้แก่ อาหาร Half Nutrient Broth (50% NB) และอาหาร Half Potato Dextrose Broth (50% PDB) ชนิดละ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมร่วมกับสารถนอมอาหาร 5 ชนิดได้แก่ กรดอะซิติค (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรกซิตริก (citric acid) กรดมาลิค (malic acid) และเกลือโซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) ให้ได้ความเข้มข้นข้น 0.3% (ศิวาพร, 2535) ส่วนชุดควบคุมคือ น้ำปั่นก้านช่อผลลำไยที่ไม่เติมสารถนอมอาหาร โดยแบ่งสารละลายที่ได้ใส่หลอดทดลองหลอดละ 20 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm2^{\circ}$c)โดยไม่เขย่าหลอดทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงนำสารละลายต่างๆ มาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี dilution drop plate บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และ อาหาร Nutrient Agar (NA) บันทึกปริมาณโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร

2. การทดสอบผลของสารผสมระหว่างสารถนอมอาหารบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จากก้านช่อผลลำไย

เตรียมน้ำปั่นก้านช่อผลลำไยด้วยวิธีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และเตรียมสารละลายผสมระหว่างสารถนอมอาหารทั้ง 5 ชนิดที่ระบุในการทดลองที่ 1 โดยการจับคู่สารทั้งหมดในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก หรือน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วจึงเติมน้ำปั่นก้านช่อผลลำไยลงไปในสารละลายผสมที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้นของสารถนอมอาหาร 0.3% คนจนสารละลาย แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายทั้งหมด 10 ชุด สำหรับชุดควบคุม คือหลอดที่มีน้ำปั่นก้านช่อผลลำไยที่ไม่เติมสารถนอมอาหาร หลังจากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการบันทึกผลเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3. การทดสอบหา Minimum Inhibition Concentration (MIC) ของสารผสมระหว่างสารถนอมอาหารต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในช่อผลลำไย

คัดเลือกสารละลายของสารถนอมอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำปั่นก้านช่อผลลำไยที่ได้ผลดีจากการทดลองที่ 1 และจากการทดลองที่ 2 ได้แก่ acetic acid, formic acid, sodium benzoate ผสมกับ acetic acid, sodium benzoate ผสมกับ formic acid และ citric acid ผสมกับ malic acid เตรียมให้มีความเข้มข้น 0.075, 0.15 และ 0.3 % โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเติมน้ำตาลทรายขาวเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% แล้วแบ่งใส่ในขวดแก้วขวดละ 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของสารถนอมอาหารแต่ละชนิดทั้งหมด 9 ชุด ปิดขวดแก้วด้วยพลาสติก polyethylene รัดปากขวดด้วยยางวง เพื่อยึดก้านช่อผลลำไย และนำก้านช่อผลลำไยมาตัดใต้น้ำ แล้วนำมาแช่ในสารละลายต่างๆ ที่เตรียมไว้ ส่วนชุดควบคุมมีทั้งหมด 5 ชุด ได้แก่ ชุดที่แช่ก้านช่อผลลำไยในสารละลายน้ำตาลทรายขาว 3 ระดับ คือเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% ชุดที่แช่ก้านช่อผลลำไยในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และชุดที่วางช่อผลในสภาพห้อง บ่มแต่ละชุดทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลวันที่ 0, 2, 4 และ 6 วัน

การบันทึกผล

วัดสีผิวด้านในและด้านนอกของเปลือกผลลำไยด้วยเครื่องมือวัดสี (chroma meter) ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-200 โดยแสดงเป็น ค่า L* (ความสว่าง) chroma (C*) และ hue (h°)

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

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

C* = chroma ($C^* = [a^{*2}+b^{*2}]^{1/2}$)

h° = hue angle (h° = arctangent b*/a*)

ค่า L* (ความสว่าง) เป็นค่าที่แสดงความสว่างของสีวัตถุ หากมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำ แต่ถ้าหากเข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง

ค่า C* เป็นค่าที่แสดงความเข้มของวัตถุ คือ ค่าเข้าใกล้ศูนย์แสดงว่าวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) มีค่าสูงเข้าใกล้ 60 แสดงว่าวัตถุมีสีเข้ม

ค่า hue angle เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง	45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงเหลือง
90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว	135-180 องศา แสดงเหลืองเขียวถึงเขียว
180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงน้ำเงินเขียว	225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน
270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง	315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

โดยวัดสี 5 ผลต่อชุดทดลองของการทดลองต่อวันที่บันทึกผล

วัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid: TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer โดยนำน้ำลำไยมาหยดลงบนกระจกของเครื่องแล้วอ่านค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ (° brix) ทำการวัดค่า 5 ผลต่อชุดทดลองในแต่ละวันที่บันทึกผล และในวันสุดท้ายของการทดลอง นำสารละลายของแต่ละชุดทดลองมาทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี dilution drop plate บนอาหาร PDA และ NA บันทึกปริมาณโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์นำมาคำนวณหาค่า colonies forming unit per milliliter (CFU/ml)

4. การทดสอบผลของสารเคลือบผิวที่บริโภคได้บางชนิดต่อการสูญเสียน้ำของผลลำไย

เตรียมสารละลายของสารเคลือบผิว 7 ชนิด ได้แก่ ไคโตซาน แป้งข้าวเจ้า แป้งเท้ายายม่อม แป้งมัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม และ Sta-fresh (บริษัทลานนาเกษตร จำกัด)โดยวิธีการเตรียมดังนี้คือ สารละลายของไคโตซาน (ผลิตจากเปลือกกุ้งอยู่ในรูปเกล็ดสีขาวขุ่น) โดยใช้เกล็ดไคโตซานน้ำหนัก 2 กรัม ละลายด้วยกรดอะซิตริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 99 มิลลิลิตร จะได้ไคโตซานเข้มข้น 2% แบ่งมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 0.5 และ 1% การเตรียมสารละลายของแป้งข้าวเจ้า แป้งเท้ายายม่อมและแป้งมัน โดยชั่งน้ำหนักแป้งแต่ละชนิด น้ำหนัก 1, 3 และ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายในแป้งแต่ละชนิดแล้วนำไปต้มจนแป้งสุก (เนื้อแป้งมีลักษณะสีใส) จะได้ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% การเตรียมอิมัลชั่นของน้ำมันถั่วเหลือง (ตราองุ่น) และน้ำมันปาล์ม (ตราปาล์ม) โดยใช้ไข่แดงเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (เสาวคนธ์, 2544) ใช้ไข่แดงผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ(เป็นตัวทำละลาย) เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และการเตรียม Sta-fresh ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวทำละลายโดยเตรียมความเข้มข้น 5, 10 และ 20% นำช่อผลลำไยมาเคลือบผิวด้วยสารละลายที่เตรียมไว้จนทั่วผลและก้านของช่อผล นำไปตัดก้านช่อผลใต้น้ำแล้วแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ส่วนชุดควบคุมมี 2 ชุดได้แก่ ช่อผลลำไยที่ไม่ได้เคลือบผิวผลแล้วแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และผลลำไยที่ไม่เคลือบผิวแต่ไม่แช่ช่อผลในน้ำ บ่มแต่ละชุดทดลองไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลทุก 0, 2,4 และ 6 วัน

การบันทึกผล

วัดการสูญเสียน้ำหนักสดของผลลำไย โดยการชั่งน้ำหนักช่อผลลำไย 5 ผล ก่อนนำไปแช่ในสารละลายต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำหนักผลที่ชั่งได้ในแต่ละระยะการเก็บรักษา เก็บผลการทดลองทุกวันที่ 2, 4 และ 6 นำมาคำนวณการสูญเสียน้ำหนักสดของผลลำไยโดยใช้สูตร

น้ำหนักที่สูญเสียของช่อผลลำไย = น้ำหนักผลสดก่อนทดลอง - น้ำหนักผลหลังการเก็บรักษา

วัดสีผิวด้านนอกและด้านในของเปลือกผลลำไย ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) โดยการวัดผลลำไย 5 ผลต่อชุดทดลองในแต่ละครั้งของการบันทึกผล

และในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาผลลำไยทำการแยกเชื้อราจากขั้วและเปลือกของผลลำไย โดยการนำผลลำไยชุดการทดลองละ 5 ผล มาตัดบริเวณขั้วผลจนถึงบริเวณเนื้อที่ติดกับขั้วและเปลือกให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร 10 ชิ้นต่อผล นำมาฆ่าเชื้อด้วย Clorox เข้มข้น 10% เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ซับน้ำให้หมาด นำชิ้นพืชไปวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน บันทึกจำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์เชื้อราที่เกิดบนชิ้นพืช

$$\text{เปอร์เซ็นต์ชิ้นพืชที่มีการเข้าทำลาย} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่มีเชื้อราเจริญ}}{\text{จำนวนชิ้นพืชทั้งหมด}} \times 100\%$$

5. การทดสอบผลของสารถนอมอาหารและสารเคลือบผิวต่ออายุการเก็บรักษาของผลลำไย

คัดเลือกสารเคลือบผิวที่สามารถลดปริมาณการสูญเสียน้ำหนักสดของผลลำไย จากการทดลองที่ 4 ได้แก่ ไคโตซานเข้มข้น 2% แป้งข้าวเจ้า 1% แป้งเท้ายายม่อม 1%c แป้งมัน 5% และ Sta-fresh 5% มาเคลือบผลลำไย และตัดก้านช่อผลลำไยใต้น้ำ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายที่หาค่า MIC ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ได้ผลดีจากการทดลองที่ 3 ได้แก่ 1) สารละลายผสมระหว่าง acetic acid เข้มข้น 0.075% กับน้ำตาลเข้มข้น 0.5% 2) สารละลายผสมระหว่าง formic acid เข้มข้น 0.15% กับน้ำตาลเข้มข้น 0.5% 3) สารละลายผสมระหว่าง acetic acid กับ sodium benzoate เข้มข้น 0.3% และน้ำตาลเข้มข้น 1% 4) สารละลายผสมระหว่าง formic acid กับ sodium benzoate เข้มข้น 0.15% และน้ำตาลเข้มข้น 1% และ 5) สารละลายผสมระหว่าง citric acid กับ malic acid เข้มข้น 0.15% และน้ำตาลเข้มข้น 1% บันทึกผล ค่าการสูญเสียน้ำหนักสดของผลลำไย และค่าการวัดสีผิวด้านนอกและด้านในของเปลือกผล ทุก 0, 2, 4 และ 6 วัน ส่วนในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาผลลำไย ทำการแยกเชื้อราจากขั้วและเปลือกของผล (เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4) และนำสารละลายที่แช่ช่อผลลำไยมาแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหาร PDA และ NA บันทึกผลปริมาณโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์