บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์โชคอนันต์ ที่ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2545 ใช้ผลมะม่วงที่มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 250-300 กรัม/ผล นำมาทำการทดลองที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามแผนการทดลอง

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- คอลัมน์แก้วโครมาโตรกราฟ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.2 เซนติเมตร สูง 17.5 เซนติเมตร
- เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร ("Instron" model 5565, Universal Testing Machine Crop.)
- เครื่องวัดสี (ColorQuest II Hunterlab, 1997, Hunter Laboratory Inc., U.S.A.)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand Refractometer "ATAGO" model N1 วัดค่าระหว่าง 0-32%, Japan)
- ตู้ดูดควัน
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectro 22 "LABOMEB" , U.S.A.)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (HANNA model HI 9321)
- กระดาษกรอง ("Whatman" เบอร์ 4 และ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany)
  เครื่อง Hot plate and Magnetic stirrer (Whatman® model HPMS, England)
- เครื่องปั่น (Blender "Imarflex" model IF-308, Thailand)
- ถ้วยแก้ว
- กล่องกระดาษลูกฟูกที่มีความกว้าง × ยาว × สูง เท่ากับ 12 × 15.5 × 7.5 นิ้ว
- ถุงอลูมิเนียมฟอยด์ (NYLON/PE/AI/L-LDPE) ขนาดกว้าง × ยาว เท่ากับ 23.0 × 28.0 เซนติเมตร ผลิตโดยบริษัทสตรองแพ็ค จำกัด กรุงเทพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สารเคมี

- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid "Merck" Hydrochloric Acid AR Grade, E. Merck, Germany)
- กรดอะซิติก (Acetic Acid "Merck" Acetic acid glacial AR Grade, E. Merck, Germany)
- กัวอะคอล ("Fluka" Guaiacol AR Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- คอปเปอร์ซัลเฟต ("Baker" Copper sulphate AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- คลอโรฟอร์ม ("Merck" Chloroform AR Grade, E. Merck, Germany)
- ซิงอะซิเตต ("Baker" Zinc acetate dihydrate AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- โซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต ("Baker" Sodium potassium tartrate AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส ("Merck" Sodium sulphate anhydrous Lab Grade, E. Merck, Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide "Merck" Sodium hydroxide AR Grade, E. Merck, Germany)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ("Merck" Sodium hydrogen phosphate AR Grade, E. Merck, Germany)
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ("Merck" Sodium dihydrogen phosphate AR Grade, E. Merck, Germany)
- โซเดียมอะซิเตต ("Merck" Sodium acetate AR Grade, E. Merck, Germany)
- เบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน ("Fluka" Standard β-carotene, Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ ("Baker" Potassium ferrocyanide AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- เมทิลีนบลู ("Merck" Methylene blue AR Grade, E. Merck, Germany)
- แมกนีเซียมออกไซด์ ("Merck" Magnesium oxide Lab Grade, E. Merck, Germany)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ("Merck" Hydrogen peroxide AR Grade, E. Merck, Germany)
- อะซิโตน ("Baker" Acetone AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)
- เฮกเซน ("Fisher" Hexane AR Grade, Fisher Scientific, U.S.A.)
- ไฮโฟรซุปเปอร์เซล ("Sigma" Hyflo supercel diatomous earth, Lab Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- กรดตาร์ตาริก (Tartaric acid, Carlo Erba Reagent, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เปปโตน ("Merck" Peptone, AR Grade, E. Merck, Germany)
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Becto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, U.S.A.)
- อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ และรา (Becto® Potato Dextrose Agar, Difco Laboratory, U.S.A.)

3.4 วิธีการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้วางแผนการทดลองแบ่งเป็น 3 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ ส่วนประกอบทางเคมี ปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และแคโรทีน ระหว่างการสุกของผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

วัตถุดิบ

ผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ เมื่อวันที่ 6 และ 31 มีนาคม 2545 เมื่อได้ผลมะม่วงมาแล้ว นำผลมะม่วงมาเด็ดก้าน ล้างน้ำ จากนั้นนำผลมะม่วงมาแยกระยะความแก่-อ่อนโดยใช้การจม-ลอยในสารละลายน้ำเกลือ คือ คัดเลือกเอาเฉพาะผลมะม่วงที่ลอยในถังสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 3% และลอยในถังสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 5% (Subramanyam *et al.*, 1976) นำผลมะม่วงมาล้างด้วยน้ำธรรมดา 2 ครั้ง และผึ่งให้แห้ง จึงนำไปบ่มให้สุก

นำผลมะม่วงที่มีระยะความแก่-อ่อนใกล้เคียงกันตามขั้นตอนข้างต้น มาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 บรรจุใส่กล่องกระดาษที่มีความกว้าง × ยาว × สูง เท่ากับ 12 × 15.5 × 7.5 นิ้ว กล่องละประมาณ 3 กิโลกรัม
- กลุ่มที่ 2 บรรจุผลมะม่วงในกล่องกระดาษเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 โดยผลมะม่วงในกลุ่มที่ 2 นี้บ่มให้สุกด้วยแคลเซียมคาร์ไบด์ (CaC_2) ในอัตราส่วนผลมะม่วง 3 กิโลกรัมต่อแคลเซียมคาร์ไบด์ 10 กรัม (จริงแท้, 2538) สุ่มตัวอย่างผลมะม่วงออกมาวิเคราะห์ทุกๆ 2 วัน จนกระทั่งผลมะม่วงมีส่วนที่เน่าเสียเกิน 40% ของผล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ผล

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก. การวัดสี ทำการวัดสีเปลือก สีเนื้อที่ติดกับเปลือก สีเนื้อที่ติดกับเมล็ด และสีเนื้อมะม่วงที่ปั่นผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuest II (Hunter Laboratory Inc., U.S.A.)

การใช้เครื่อง ColorQuest II (Hunter Lab Inc., U.S.A.) ก่อนใช้เครื่องทุกครั้งได้ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานสีขาวและเทา นำผลมะม่วงมาวัดสีเปลือก สีเนื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มะม่วงที่ปอกเปลือกออก สีเนื้อมะม่วงด้านที่อยู่ติดกับเมล็ดเมื่อฝานชิ้นเนื้อมะม่วงออก และสีเนื้อมะม่วงที่ปั่นผสมรวมกัน วัดสีผลละ 3 จุด ซ้ำละ 3 ผล ทำการวัด 3 ซ้ำ รายงานค่าสีที่วัดได้เป็นค่า L*, a* และ b* เมื่อ L* = the lightness factor (value) a* และ b* = the chromaticity coordinates

ค่า L* ที่มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีขาว ค่า a* ที่ค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง หากค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว และค่า b* ที่ค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน ทั้ง a* และ b* มีค่าเป็นศูนย์แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

นำค่า a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°) โดยใช้สูตร

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

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

ถ้า $a > 0$ และ $b \geq 0$ ให้ H° = ค่า A

ถ้า $a < 0$ และ $b \geq 0$ ให้ H° = 180 + ค่า A

ถ้า $a < 0$ และ $b < 0$ ให้ H° = 180 + ค่า A

ถ้า $a > 0$ และ $b < 0$ ให้ H° = 360 + ค่า A

(ที่มา Raymond, 1992)

ข. การวัดความแน่นเนื้อ ทำการวัดความแน่นเนื้อหรือลักษณะเนื้อสัมผัสของผลมะม่วง โดยใช้เครื่อง Instron model 5565, Universal Testing Machine.

นำผลมะม่วงมาปอกเปลือกแล้วฝานแบ่งครึ่งผลออกเป็น 2 ชิ้น จำนวน 3 ผล วัดค่าแรงกดชิ้นละ 3 จุด ด้วยหัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 มิลลิเมตร ค่าแรงกดที่วัดได้มีหน่วยเป็นนิวตัน นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ก. ปริมาณกรดทั้งหมด วัดปริมาณกรดทั้งหมดในเนื้อมะม่วงโดยวิธีการไตเตรชัน และคำนวณผลในรูปของกรดซิตริกตามวิธี AOAC (2002)

สารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มาจำนวน 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน (Hydrochloric acid, HCl AR Grade) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

วิธีทำ

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ละทรีตเมนต์ของแต่ละการทดลอง มาชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 5 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer นำสารละลายตัวอย่างไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ อ่านค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายตัวอย่าง เมื่อเครื่องพีเอชมิเตอร์อ่านค่าพีเอชได้ 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างมาตรฐานที่ใช้ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำปริมาตรของสารละลายด่างที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ในรูปกรดซิตริก โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.007 กรัม

ข. การวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้ง ได้ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องพีเอชมิเตอร์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 4.0 ตามลำดับ

ค. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำโดยใช้ Hand refractometer

นำเนื้อมะม่วงแต่ละทรีตเมนต์ของแต่ละการทดลอง มาคั้นเอาน้ำออกจากส่วนเนื้อ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ Hand refractometer ("ATAGO" model N1) ซึ่งวัดค่าได้ระหว่าง 0 - 32% โดยใช้น้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนใช้วัดตัวอย่างน้ำมะม่วงทุกครั้ง

ง. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Lane and Eynon (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

สารเคมี

1. สารละลาย Carrez No.1 เตรียมโดยละลายซิงอะซิเตต (Zinc acetate dihydrate AR Grade) จำนวน 21.9 กรัม ในน้ำกลั่นที่มีกรดอะซิติก (Acetic acid glacial AR Grade) จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารละลาย Carrez No.2 เตรียมโดยละลายโพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide AR Grade) จำนวน 10.6 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
3. สารละลาย Fehling No.1 เตรียมได้โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate AR Grade) จำนวน 69.278 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
4. สารละลาย Fehling No.2 เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide NaOH AR Grade) จำนวน 100 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรต (Sodium potassium tartrate AR Grade) จำนวน 346 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
5. สารละลายเมทิลีนบลู (Methylene blue AR Grade) ความเข้มข้น 1%
6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล (Hydrochloric acid AR Grade)
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มัล (Sodium hydroxide AR Grade)

วิธีทำ

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันมาจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณให้เนื้อมะม่วงกระจายตัว เติม clearing agent คือ สารละลาย Carrez No.1 & No. 2 ลงไปอย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ดังต่อไปนี้

- *การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน*

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปิเปตสารละลาย Felhing No.1 และ No.2 อย่างละ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์คขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่แท่งแม่เหล็ก นำไปตั้งบนเครื่อง hot plate stirrer จนเดือดไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลตัวอย่างจนสีน้ำเงินจางลง หยดสารละลายเมทิลีนบลูลงไป 1 หยด ไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ถ้าปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้อยู่ในช่วง 15-50 มิลลิลิตร แสดงว่าสารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นเหมาะสม ทำการไตเตรทสารละลายตัวอย่างให้ได้ค่าที่ถูกต้องกับสารละลาย Felhing โดยปล่อยสารละลายน้ำตาลจากบิวเรตลงไปทันที โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าที่ใช้ในการไตเตรทครั้งแรกประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ปล่อยให้เดือด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นาน 2 นาที หยดสารละลายเมทิลีนบลู 1 หยดไตเตรทจนสีฟ้าหายไปหมด เหลือตะกอนสีส้มแดง จดปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง นำปริมาตรสารละลายน้ำตาลที่ใช้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่างจากตารางมาตรฐาน

- *การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน*

ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาส์คขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6.34 นอร์มัล ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็น แล้วปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มัล แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างนี้ใส่ลงในบิวเรต ทำการไตเตรทกับสารละลาย Fehling เช่นเดียวกับการหาปริมาณน้ำตาลก่อนอินเวอร์ชัน

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

น้ำตาลทั้งหมด (%) = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลซูโครส + D_1

เมื่อ D_1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลก่อนการทำอินเวอร์ชัน

D_2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลภายหลังการทำอินเวอร์ชัน

จ. ปริมาณแคโรทีนอยด์และแคโรทีนในเนื้อมะม่วง

วิธีการที่ใช้ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2002)

การสร้างกราฟมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

สารเคมี

1. เบต้า-แคโรทีนมาตรฐาน (Standard Bata-Carotene)
2. คลอโรฟอร์ม(Chloroform AR Grade)
3. เฮกเซน (Hexane AR Grade)
4. อะซิโตน (Acetone AR Grade)

วิธีการ

1. ชั่งสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน 0.005 กรัม ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร ละลายสารมาตรฐานด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน จนได้ 50 มิลลิลิตร
4. ปิเปตสารละลายในข้อ 3 มา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายผสมของอะซิโตน 10% ในเฮกเซน
5. นำสารละลายในข้อ 4 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมของอะซิโตน 10% ในเฮกเซนเป็น blank
6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 จากนั้นนำสารละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสมของอะซิโตน 10% ในเฮกเซนเป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเบต้า-แคโรทีน (ppm) กับค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ แล้วทำสมการเส้นตรงจากกราฟ

วิธีการเตรียมสารละลายผสมของอะซิโตน 10 % ในเฮกเซน ทำโดยปิเปตอะซิโตนมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ และแคโรทีนดัดแปลงจาก AOAC (2002)

สารเคมี

1. ไดอะตอมมัสเอิร์ทไฮโฟลซุปเปอร์เซล (Diatomous Earth Hyflo Supercel Lab Grade)
2. แมกนีเซียมออกไซด์ (Magnesium oxide, MgO AR Grade)
3. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Sodium Sulfate Anhydrous AR Grade)
4. เฮกเซน (Hexane AR Grade)
5. อะซิโตน (Acetone AR Grade)
6. สารดูดซับ ผสมไดอะตอมมัสเอิร์ทไฮโฟลซุปเปอร์เซลกับแมกนีเซียมออกไซด์ ในอัตราส่วน 1 : 1

การเตรียมคอลัมน์

ใส่สำลีปิดที่ปลายล่างคอลัมน์ให้สูงจากปลายขึ้นมา 1 เซนติเมตร เติมสารดูดซับลงในคอลัมน์จนสูงประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วใช้แท่งแก้วกดทับให้แน่น เติมสารดูดซับลงไป และทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การกดทับเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนสารดูดซับสูง 10 เซนติเมตร แล้วเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสให้มีความสูง 1 เซนติเมตร

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงปั่นละเอียดมา 5.000 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน 100 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่อง magnetic stirrer นาน 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แยกกากเนื้อมะม่วงกับส่วนใส โดยเก็บส่วนใสในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกากเนื้อมะม่วงด้วย อะซิโตน 25 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และเฮกเซน 25 มิลลิลิตรอีก 1 ครั้ง นำส่วนใสของอะซิโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก ทำการล้างแยกเอาอะซิโตนออก โดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยกด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีอะซิโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่ นำสารผสมแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 โดยรองรับสารผสมด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำสารที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของ blank (สารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน) ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ยและนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วงต่อไป

การแยกแคโรทีน

ปิเปตสารละลายผสมที่ได้จากการสกัดในตอนสุดท้าย 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงในคอลัมน์ที่บรรจุสารดูดซับไว้ ปล่อยให้สารละลายผสมไหลผ่านสารดูดซับจนเกือบหมด แล้วจึงเติมสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซนลงไป เพื่อชะให้แคโรทีนแยกออกจากสารชนิดอื่นๆ รองรับแคโรทีนที่ออกจากคอลัมน์จนหมด นำสารละลายผสมแคโรทีนที่ได้ไประเหยในตู้ดูดควันจนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้ เปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงของ blank คือ สารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมาหาค่าเฉลี่ย และนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนในเนื้อมะม่วงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลขหมู่..... 634.44
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ร423 ง
C.4

สำหรับคอลัมน์ภายหลังจากแยกแคโรทีนออกมาแล้ว ให้เติมสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซนต่อไปจนสารชนิดอื่นๆ ที่ยังไม่ถูกแยกออกในตอนแรกถูกชะออกจากคอลัมน์จนหมด แช่สารในคอลัมน์ด้วยสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน เพื่อใช้ในครั้งต่อไปได้

การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์และแคโรทีน

นำค่าที่อ่านได้จากสารละลายเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน มาคำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$$y = 0.1047x + 0.0013$$

โดย y = ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ของตัวอย่างแคโรทีนอยด์หรือแคโรทีน

x = ปริมาณแคโรทีนอยด์ หรือแคโรทีนในตัวอย่าง (ppm)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มา คำนวณหาปริมาณแคโรทีนอยด์ หรือแคโรทีนในตัวอย่าง ต่อไป

ปริมาณแคโรทีนอยด์

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์อยู่ = x mg

สารละลายเจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยด์อยู่ = (x/1000)×50 mg

ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้มาจากตัวอย่างเนื้อมะม่วง 5 กรัม

เนื้อมะม่วงปั่น 5 กรัม มีแคโรทีนอยด์อยู่ = z mg

เนื้อมะม่วงปั่น 1 กรัม มีแคโรทีนอยด์อยู่ = z/5 mg

เปลี่ยนหน่วยมิลลิกรัม (mg) เป็นไมโครกรัม (μg) โดยการคูณด้วย 1000 เพื่อใช้ในการรายงานผลการทดลอง

ปริมาณแคโรทีน

สารละลายเจือจางปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยู่ = x mg

สารละลายเจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยู่ = (x/1000)×50 mg

ปริมาณแคโรทีนมาจากตัวอย่างสารแคโรทีนอยด์ 10 มิลลิลิตร

สารละลายผสมแคโรทีนอยด์ 10 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยู่ = z mg

สารละลายผสมแคโรทีนอยด์ 50 มิลลิลิตร มีแคโรทีนอยู่ = (z/10) ×50 mg

ปริมาณแคโรทีนที่ได้มาจากตัวอย่างเนื้อมะม่วง 5 กรัม

เนื้อมะม่วงปั่น 5 กรัม มีแคโรทีนอยู่ = a mg

เนื้อมะม่วงปั่น 1 กรัม มีแคโรทีนอยู่ = a/5 mg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนหน่วยมิลลิกรัม (mg) เป็นไมโครกรัม (μg) โดยการคูณด้วย 1000 เพื่อใช้ในการรายงานผลการทดลอง

* ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร กับตัวอย่างสารแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ และแคโรทีนที่แยกได้ เป็นค่าดูดกลืนแสงสูงสุดของสารเบต้า-แคโรทีนมาตรฐานในสารผสมอะซิโตน 10% ในเฮกเซน ดังนั้น ทั้งแคโรทีนอยด์และแคโรทีนในเนื้อมะม่วงจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ แต่ไม่ใช้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด จึงไม่สามารถรายงานเป็นปริมาณของเบต้า-แคโรทีนได้ ดังนั้นค่าที่ได้จึงเป็นค่าของแคโรทีนอยด์ และแคโรทีน

ตอนที่ 2 การศึกษาวิธีการลดปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) ของเนื้อมะม่วงหั่นชิ้นก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

นำผลมะม่วงที่บ่มให้สุกด้วยแคลเซียมคาร์ไบด์ มาใช้ในการทดลอง โดยแต่ละทรีตเมนต์ใช้มะม่วง 1 ผล ผ่านแบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 นำเนื้อมะม่วงมาสกัดเอนไซม์ (enzyme extraction) ดัดแปลงจากวิธีของ Huang *et al.* (1990) จากนั้นนำเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ POD ตามวิธีของ Nagle and Haard (1975)

ส่วนที่ 2 นำเนื้อมะม่วงในส่วนนี้ไป ผ่านขั้นตอนการทำทรีตเมนต์ต่างๆ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

- แบบที่ 1 ใช้ความร้อน โดยทำการลวกเนื้อมะม่วงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 65-70, 75-80 และ 85-90 องศาเซลเซียส และระยะเวลาลวก 3 ระดับ คือ 30, 60 และ 90 วินาที หลังจากลวก นำเนื้อมะม่วงแช่ในน้ำเย็น 5 องศาเซลเซียสทันที ปล่อยให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำไปสกัดเอนไซม์ และวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ POD ที่เหลืออยู่
- แบบที่ 2 ใช้สารละลายกรดซิตริก โดยทำการแช่เนื้อมะม่วงในสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1%, 0.5% และ 1.0% ระยะเวลาแช่ 3 ระดับ คือ นาน 30, 60 และ 90 วินาที จากนั้นนำไปสกัดเอนไซม์ และวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ POD ที่เหลืออยู่

การทดลองทำทั้งหมด 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้เนื้อมะม่วง 1 ผล โดยหั่นเนื้อมะม่วงแต่ละผลออกเป็น 2 ชิ้น ใช้เป็นชุดควบคุม 1 ชิ้น และทรีตเมนต์ 1 ชิ้นต่อผล เปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในเนื้อมะม่วงจากส่วนที่ 1 (ชุดควบคุม) และส่วนที่ 2 ที่ผ่านการยับยั้งกิจกรรมด้วยความร้อนหรือสารละลายกรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

สารเคมี

1. สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate AR Grade) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท ($Na_2HPO_4.2H_2O$ MW= 177.99 g/mol) มาจำนวน 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
2. สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate AR Grade) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท (NaH_2PO_4.H_2O MW = 137.99 g/m) มาจำนวน 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
3. สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมฟอสเฟต (0.5 M Sodium phosphate buffer pH 6.2) นำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมา 100 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2
4. สารละลายโซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate AR Grade) ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมอะซิเตต แอนไฮดรัส (CH_3COONa MW = 82.04 g/mol) มาจำนวน 0.8377 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
5. กรดอะซิติก (Acetic acid glacial AR Grade) ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปิเปตกรดอะซิติก 0.57 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
6. สารละลายบัฟเฟอร์ของโซเดียมอะซิเตต (0.1 M Sodium acetate pH = 6.0) นำสารละลายโซเดียมอะซิเตตมา 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดอะซิติกพร้อมคนสารละลายผสมตลอดเวลา จนสารละลายมีพีเอชเท่ากับ 6.0
7. สารละลายกัวอะคอล 1% (Guaiacal AR Grade) ชั่งกัวอะคอล 0.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
8. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% (Hydrogen peroxide 30% AR Grade) ชั่งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มา 3.33 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

* สารละลายในข้อ 7 และ8 เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง (freshly solution)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

- *การสกัดเอนไซม์* (enzyme extraction) ดัดแปลงจากวิธีของ Huang *et al.* (1990)

ชั่งเนื้อมะม่วงที่บดละเอียดมา 1 กรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจากนั้นเติมสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ (extraction solution) คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 ในอัตราส่วนเนื้อมะม่วง : สารละลายสกัดเท่ากับ 1 : 4 เมื่อบดเนื้อมะม่วงเข้ากับสารละลายที่สกัดได้แยกสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 ใช้ส่วนใสของสารละลายที่สกัดได้ไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส การปั่นและสกัดตัวอย่างกระทำภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้อ่างน้ำแข็ง

- *การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส* (peroxidase : POD) ดัดแปลงจากวิธีของ Nagle and Haard (1975)

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายวิเคราะห์เอนไซม์ POD อยู่ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectronic 21) ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (assay mixture) ได้แก่ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มีกัวอะคอล 1.0% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1.0%

การคำนวณปริมาณเอนไซม์

A = ความชันของกราฟช่วงที่เป็นเส้นตรง/ 0.001

โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 วินาที ในสภาวะที่ทำการทดลอง

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

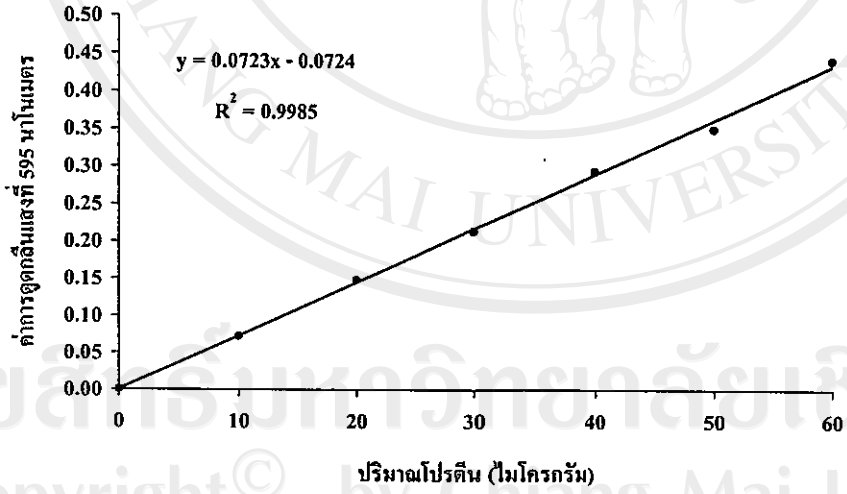
ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin, BSA) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตรจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie (0.05% Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5% ethanol และ 10% phosphoric acid) ลงไปหลอดละ 3.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ มา 50 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย 0.05 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ลงในไปให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie (0.05% Coomassie brilliant blue G-250 ใน 5% ethanol และ 10% phosphoric acid) ลงไปหลอดละ 3.00 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน (Bradford, 1976)



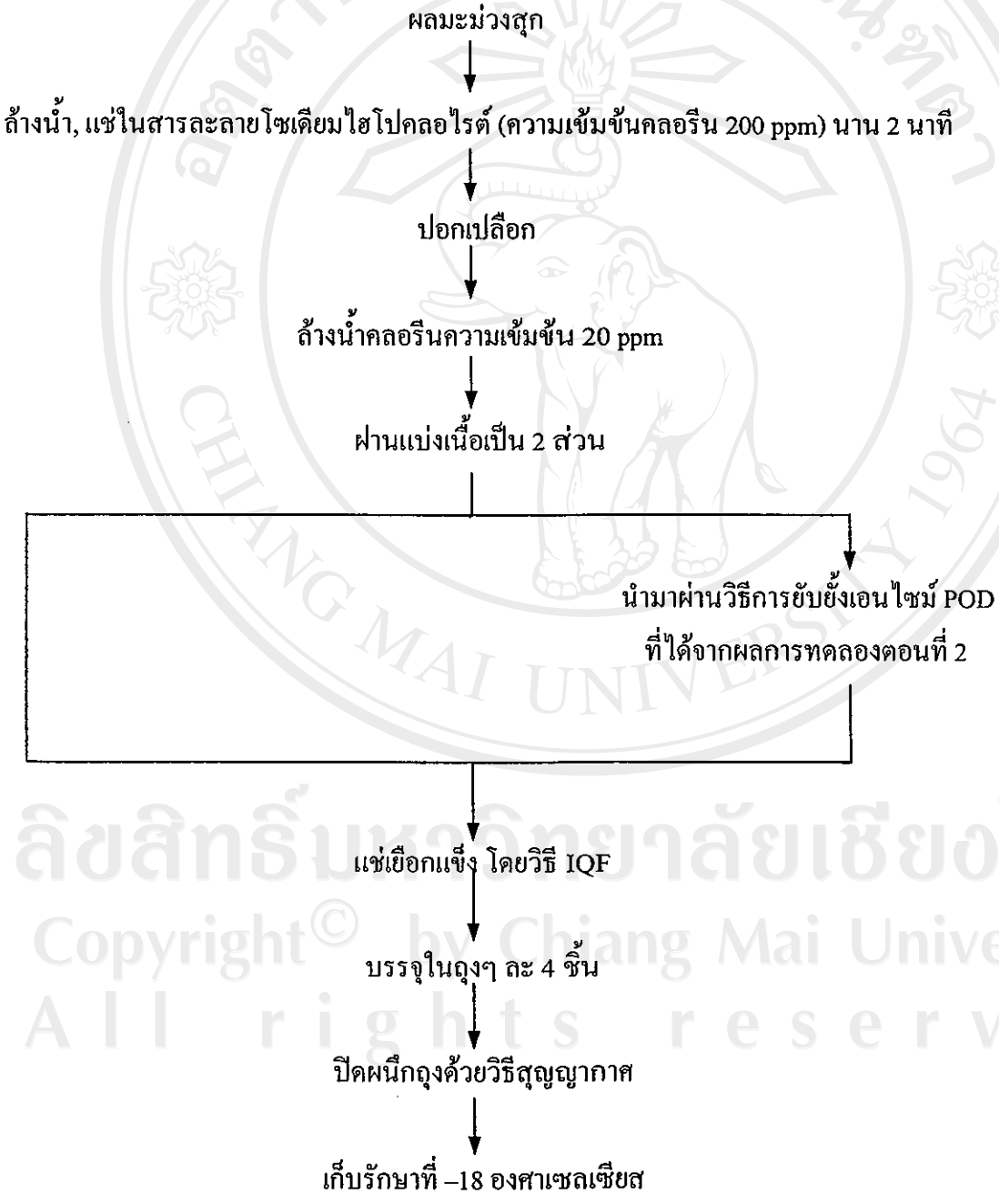
รูปที่ 3.1 กราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีของเนื้อมะม่วงสุกแช่เยือกแข็งระหว่างการเก็บรักษา

วัตถุดิบ

ผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ เป็นผลมะม่วงที่มีระยะสุกทางการค้า นำผลมะม่วงมาแปรรูป ตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้



หมายเหตุ น้ำที่ใช้ในขั้นตอนหลังจากปอกเปลือกต้องมีความเข้มข้นของคลอรีน 20 ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 เดือน สุ่มตัวอย่างออกมาทุกเดือน เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ส่วนประกอบทางเคมี ปริมาณแคโรทีนอยด์และแคโรทีนและปริมาณจุลินทรีย์ เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างเนื้อมะม่วงชุดควบคุมกับเนื้อมะม่วงที่ผ่านกระบวนการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง

การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และส่วนประกอบทางเคมี

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ส่วนประกอบทางเคมี ปริมาณแคโรทีนอยด์ และแคโรทีน เช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

ก. ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2002)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% (Peptone AR Grade) ชั่งเปปโตน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (AR Grede) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

วิธีทำ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างเนื้อมะม่วงแช่เยือกแข็งที่บรรจุในถุง มาวางไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 30 นาที
2. ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ เปิดถุง และตัดเนื้อมะม่วงมา 10 กรัม ใส่ในถุงตีป่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 90 กรัม นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นจนตัวอย่างแตกละเอียดและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน สารละลายที่ได้เป็นตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ได้เป็นสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2}
4. นำตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 มาเจือจางให้เป็น 1:1000 หรือ 10^{-3} โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3

การตรวจนับจุลินทรีย์

ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่าง และอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามกำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับว่ามี Mesophilic aerobic bacteria ในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัม

* ปิเปต และจานเพาะเชื้อ ต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ข. ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2002)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ความเข้มข้น 0.1% (Peptone AR Grade) ชั่งเปปโตนมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือ หลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (AR Grade) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้ต้องปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 3.5 โดยการเติมสารละลายกรดตาร์ตาริก ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 1.9 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายกรดตาร์ตาริก (Tartaric acid, $HOOC(CHOH)_2COOH$) ความเข้มข้น 10% ชั่งกรดตาร์ตาริก 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทำ

1. การเตรียมตัวอย่าง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจางที่เตรียมไว้ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ระดับเจือจางละ 2 จาน โดยเริ่มดูดจากตัวอย่างอาหารที่เจือจางมากสุด จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่หลอมเหลวลงในจานเพาะเชื้อ ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 $\pm$ 3 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อได้ตามกำหนด ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเพาะเชื้อ โดยจำนวนจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำค่ามาเฉลี่ยจากทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในรูปจำนวนโคโลนีต่อเนื้อมะม่วง 1 กรัม

* ปิเปตและจานเพาะเชื้อต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved