# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**3.1 อุปกรณ์**

เครื่องเขย่าสาร (Vortex ; Scientific Industries : G-560E, USA)

เครื่องความดันสูง (High Pressure Processing ; Mini Foodlab : FPG 5620, England)

เครื่องฆ่าเชื้ออาหาร (Autoclave ; Gallenkamp, England)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius : CP224S, Germany)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precisa : BJ610C, Switzerland)

เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Supervac : GK100, Austria)

เครื่องปั่นผสม (Blender ; National , Thailand)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge ; Hettich zentrifugen : Rotina 46R, Germany)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV - Vis Spectrophotometer ; Perkin Elmer : Lambda 35, Germany)

เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter ; Sartorius : PB-10, Germany)

เครื่องวัดค่า water activity ($a_w$ meter ; Aqualab : serie 3, USA)

เครื่องวัดสี (Colorimeter ; Minolta Chroma meter : CR-300, Japan)

ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow ; Heal Force : HFsafe 1200/C, China)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator ; Gallenkamp, England)

ตู้อบหาความชื้น (Hot Air Owen ; Binder : FD 115, Germany)

เตาอบไมโครเวฟ (Microwave owen ; Sharp, Thailand)

ปิเปตถ่ายสาร (Transfer Pipette ; Transferpette, Germany)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath ; GFL : 1032, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2 สารเคมี**

กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid ; $H_2SO_4$, Mw 98.08, Assay 95 – 97 %, Merck, Germany)

กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid ; $H_3PO_4$, Mw 98.00, Assay 85 %, Merck, Germany)

กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid ; $C_{18}H_{32}O_2$, Mw 280.46, Assay 60 – 74 %, Fluka, Germany)

กรดออกซาลิค (Oxalic acid dehydrate ; $(COOH)_2 \cdot 2H_2O$, Mw 126.07, Assay 99.8 %min, Carlo Erba)

กรดอะซิติก (Acetic acid glacial ; $CH_3COOH$, Mw 60.05, Assay 99.8 %min, Merck, Germany)

กรดแอสคอร์บิค (L-ascorbic acid ; $C_6H_8O_6$, Mw 176.13, Assay 99.0 – 100.5 %, Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid ; HCl, Mw 36.5, Assay 37.0 %, Merck, Germany)

กรด 3,5 – ไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-Dinitrosalicylic acid ; $C_7H_4N_2O_7$, Mw 228.19, Assay $\geq$ 98.0 %, Fluka, China)

กัวอะคอล (Guaicol ; $C_7H_8O_2$, Mw 124.14, Assay $\geq$ 98.0 %, Fluka, Japan)

แคทีคอล (Pyrocatechol ; $C_6H_6O_2$, Mw 110.11, Assay $\geq$ 98.0 %, Fluka, China)

โซเดียมอะซิเตรท (Sodium acetate hydrated ; $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, Mw 136.08, Assay 99.0 – 100.5 %, Ajax Finechem, Australia)

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen orthophosphate ; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , Mw 156.01, Assay 99.0 – 101.0 %, Ajax Finechem, Australia)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiun hydroxide ; NaOH, Mw 40.00, Assay 99.0 %, Merck, Germany)

ทวีนน์ 20 (Tween 20 ; $C_{58}H_{114}O_{26}$, Fw 1227.54, Fisher Scientific, U.S.A.)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous ; $Na_2HPO_4$, Mw 141.96, Fisher Scientific, UK.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2,6 ไดคลอโรอินโดฟีนอล (2,6-Dichloroindophenol sodium salt ; Mw 290.08, Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride ; KCl, Mw 74.55, Assay 99.8 %min, Ajax Finechem, Australia)

โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium Sodium (+) Tartrate ; $KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$, Mw 282.22, Assay 99.0 – 102.0 %, Ajax Finechem, Australia)

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide ; Assay 29.0 – 31.0 %, Merck, Germany)

เอทานอล (Ethanol ; $CH_3CH_2OH$, Assay 95%, C.M. Chemical & Lab Supplies, Thailand)

Bovine Serum Albumin (BSA ; Assay 98 %min, USB, USA)

Coomassie Brilliant blue G-250 (SERVA, Germany)

Peptone water (Merck, Germany)

Plate count agar (PCA ; Merck, Germany)

Potato Dextrose agar (PDA ; Merck, Germany)

**3.3 วัตถุดิบ**

พริกพันธุ์จักรพรรดิ์ (จากตลาดเมืองใหม่ : เชียงใหม่, ประเทศไทย)

หอมแดง (จากตลาดเมืองใหม่ : เชียงใหม่, ประเทศไทย)

กระเทียม (จากตลาดเมืองใหม่ : เชียงใหม่, ประเทศไทย)

**3.4 วิธีการทดลอง**

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ตอน ดังนี้

**ตอนที่ 1 ศึกษาคุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ในพริกหนุ่มพันธุ์จักรพรรดิ์**

นำพริกหนุ่มพันธุ์จักรพรรดิ์ซึ่งใช้ในการผลิตน้ำพริกหนุ่ม มาทำการวิเคราะห์คุณภาพ จำนวน 2 ซ้ำ โดยวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**1. คุณภาพทางกายภาพ**

**1.1 สีระบบ CIE ($L^*$, $a^*$, $b^*$)** (Minolta Chroma Meter : Model CR-300 )

**วิธีการวิเคราะห์**

นำตัวอย่างมาใส่ลงในภาชนะ เปิดเครื่องวัดสี และควรทำการ Calibrate เครื่องก่อนวัดทุกครั้ง เลือก mode การวัดเป็น mode สี $L^*$, $a^*$ และ $b^*$ ทำการวัดสีและบันทึกค่าสีที่อ่านได้

$L^*$ คือ ค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 - 100 ถ้าค่า $L^*$ เข้าใกล้ 0 หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยจนเป็นสีคล้ำ หากค่า $L^*$ เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างสว่างมากจนเป็นสีขาว

$a^*$ คือ ค่าแสดงถึงสีแดงและสีเขียว หาก $a^*$ มีค่าเป็นบวก หมายถึง ตัวอย่างมีสีแดง หากค่า $a^*$ มีค่าเป็นลบ หมายถึง ตัวอย่างมีสีเขียว

$b^*$ คือ ค่าแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน หาก $b^*$ มีค่าเป็นบวก หมายถึง ตัวอย่างมีสีเหลือง หากค่า $b^*$ มีค่าเป็นลบ หมายถึง ตัวอย่างมีสีน้ำเงิน

**1.2 วอเตอร์แอคติวิตี ($a_w$)** (Water Activity Meter : AquaLab)

**วิธีการวิเคราะห์**

บรรจุตัวอย่างลงในตลับ $a_w$ โดยบรรจุไม่เกินครึ่งหนึ่งของความสูงของตลับ $a_w$ นำตลับที่บรรจุตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว มาวางลงใน chamber ของเครื่อง $a_w$ meter จากนั้นเลื่อน chamber เข้าไปในเครื่องให้อยู่ในสภาพพร้อมวัด แล้วหมุนปุ่มไปยังตำแหน่ง READ ตั้งทิ้งไว้จนเข้าสู่สมดุล เครื่องจะมีสัญญาณเตือน อ่านและบันทึกค่า $a_w$ ที่วัดได้

**1.3 ปริมาณความชื้น** (AOAC, 2000)

**วิธีการวิเคราะห์**

นำ moisture can อบที่ตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (w1) จากนั้นชั่งตัวอย่าง (3-4 กรัม) ใส่ลงใน moisture can ที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักตัวอย่าง (w2) นำ moisture can ที่ใส่ตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำ moisture can ออกจากตู้อบลมร้อนใส่ในโถดูดความชื้น 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่ได้ นำไปอบต่ออีก 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ (w3) (ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2. คุณภาพทางเคมี**

**2.1 ค่าความเป็นกรด – ด่าง** (pH meter)

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วมา 20 กรัม เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย คนให้เข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าความเป็นกรด – ด่าง โดยเครื่อง pH meter โดยก่อนทำการวัดควรทำการ Calibrate เครื่องด้วย buffer ก่อน จากนั้นจุ่ม Electrode ลงในตัวอย่าง รอจนกว่าค่าที่อ่านได้หยุดนิ่ง เครื่องจะปรากฏตัว S ขึ้น จดบันทึกค่า pH ที่ได้

**2.2 กิจกรรมเอนไซม์**

**2.2.1 การสกัดเอนไซม์** (ดัดแปลงจาก Flurkey and Jen, 1978)

**สารเคมี**

1. บัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ คือ 0.05 โมลาร์ Phosphate buffer pH 6.2 ซึ่งมี KCl 1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง Sodium dihydrogen orthophosphate มา 7.02 กรัม ชั่ง di-Sodium hydrogen orthophosphate มา 0.70 กรัม เติม Potassium chloride 74.55 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันจากนั้นปรับ pH เป็น 6.2 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

**การสกัดเอนไซม์**

ชั่งตัวอย่างมา 20 กรัม ใส่ในเครื่องปั่น เติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ 100 มิลลิลิตร ปั่นละเอียดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm 4 ˚C เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนสารละลายใส (Supernatant) ไว้ที่ 4 ˚C เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และไลพอกซีจิเนสในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.2.2 กิจกรรมเอนไซม์ Polyphenol Oxidase** (ดัดแปลงจาก Flurkey and Jen, 1978)

**สารเคมี**

1. บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase

บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.2 โมลาร์ Phosphate buffer pH 7.0 เตรียมโดยชั่ง Sodium dihydrogen orthophosphate มา 18.72 กรัม ชั่ง di-Sodium hydrogen orthophosphate มา 11.36 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันจากนั้นปรับ pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase

สับสเตรทที่ใช้ คือ สารละลาย Catechol ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์

**การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Polyphenol Oxidase**

ใส่บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase ลงในหลอดทดลองปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร เติมสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase ลงไป 1.00 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ที่สกัดได้ลงไป 0.25 มิลลิลิตร วัด $A_{420}$ ทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลา 5 นาที เทียบกับ Blank โดย Blank คือ บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase ปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร และสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Polyphenol Oxidase 1.00 มิลลิลิตร

**2.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase** (ดัดแปลงจาก Flurkey and Jen, 1978)

**สารเคมี**

1. บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Peroxidase

บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 โมลาร์ Acetate buffer pH 5.5 เตรียมโดยปิเปต Acetic acid มา 0.90 มิลลิลิตร ชั่ง Sodium acetate มา 11.56 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันจากนั้นปรับ pH เป็น 5.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Peroxidase

สับสเตรทที่ใช้ คือ สารละลาย 0.1 โมลาร์ Acetate buffer pH 5.5 ซึ่งประกอบด้วย 0.5% Guaiacol และ 0.1% $H_2O_2$ เตรียมโดยปิเปต Guaiacol มา 0.50 มิลลิลิตร และ $H_2O_2$ 0.333 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Peroxidase ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Peroxidase**

ใส่สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Peroxidase ลงในหลอดทดลองปริมาตร 4.80 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ที่สกัดได้ ลงไป 0.20 มิลลิลิตร วัด $A_{470}$ ทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลา 5 นาที เทียบกับ Blank โดย Blank คือ สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Peroxidase 4.80 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.20 มิลลิลิตร

**2.2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxygenase** (ดัดแปลงจาก Gokmen *et al*., 2004 and Ding *et al*., 2006)

**สารเคมี**

1. บัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase

บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.1 โมลาร์ Phosphate buffer pH 6.0 เตรียมโดยชั่ง Sodium dihydrogen orthophosphate มา 14.7 กรัม ชั่ง di-Sodium hydrogen orthophosphate มา 0.85 กรัม เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากันจากนั้นปรับ pH เป็น 6.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2. สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase

เตรียมโดยปิเปต linoleic acid มา 78.6 ไมโครลิตร และ Tween 20 มา 78.6 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 1 นอร์มัล Sodium hydroxide 0.5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจะได้สารละลายใส เติมบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase ลงไป 80 มิลลิลิตร ปรับ pH สารละลายให้ได้ 6.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์สำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase

**วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Lipoxygenase**

ใส่สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase ลงในหลอดทดลองปริมาตร 4.90 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ที่สกัดได้ลงไป 0.10 มิลลิลิตร วัด $A_{234}$ ทุกๆ 5 วินาที เป็นเวลา 5 นาที เทียบกับ Blank โดย Blank คือ สารสับสเตรทสำหรับวิเคราะห์ Lipoxygenase 4.90 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลาย** (Bradford, 1976)

**สารเคมี**

1. สารสำหรับตรวจโปรตีนในสารละลาย (Coomassie blue dye reagent)

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 50 มิลลิกรัม ใน 95 % เอทานอล 25 มิลลิลิตร คนจนสารละลายหมด แล้วจึงเติม 85 % กรดฟอสฟอริก 50 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดสีชา

**การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลาย**

สร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียมสารดังนี้

| สาร (ml) | หลอดที่ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Blank | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Coomassie blue dye reagent | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| 1 mg/ml BSA | 0 | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.10 |
| น้ำกลั่น | 0.50 | 0.48 | 0.46 | 0.44 | 0.42 | 0.40 |

เมื่อเตรียมสารตามตารางแล้วทำการผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เทียบกับ Blank

เมื่อเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีนแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างเอนไซม์ที่สกัดได้ โดยปิเปตสารตัวอย่างเอนไซม์มา 0.40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Coomassie blue dye reagent 5.00 มิลลิลิตร ผสมกันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เทียบกับ Blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.3 ปริมาณวิตามินซี** (AOAC, 2000)

**สารเคมี**

1. กรดออกซาลิค เข้มข้น 0.4 %

2. สารละลายวิตามินซีมาตรฐาน

ชั่งกรดแอสคอร์บิคบริสุทธ์มา 0.02 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิคเข้มข้น 0.4 % 60 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายวิตามินซีมาตรฐานเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐาน

ชั่ง 2,6-dichlorophenolindophenol มา 0.025 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายเก็บใส่ตู้เย็นได้ 2-3 สัปดาห์

**วิธีการวิเคราะห์วิตามินซี**

ชั่งตัวอย่างมา 20 กรัม ใส่ลงในเครื่องปั่น เติมสารละลาย กรดออกซาลิคเข้มข้น 0.4 % ลงไป 100 มิลลิลิตร ปั่น 1 นาที กรอง ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐาน จุดยุติจะเห็นสีชมพูอ่อนนานกว่า 15 วินาที จดปริมาตรสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐานที่ใช้ แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นปิเปตสารละลายวิตามินซีมาตรฐานมา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐาน จุดยุติจะเห็นสีชมพูอ่อนนานกว่า 15 วินาที จดปริมาตรสารละลายอินโดฟีนอลมาตรฐานที่ใช้ แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยในการวิเคราะห์ใหม่ควรไทเทรตกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐานก่อนทุกครั้ง

**2.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด** (James, 1995)

**สารเคมี**

1. น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 15 กรัม/ลิตร

2. กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 %

4. DNS reagent

เตรียมโดยละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid 1 กรัม ในสารละลาย 20 มิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ จากนั้นละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 30 กรัม ในน้ำกลั่น 50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาผสมกัน คนจนละลายหมดแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา

**การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาล**

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตมาจากสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 15 กรัม/ลิตร จากนั้นปิเปตสารกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ใส่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตรเติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำไปต้มใน Water bath 100 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที นำไปวัดค่า $A_{540}$ โดยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลระหว่างค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกับ $A_{540}$ ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

**วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์**

ชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดมาประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Erlenmayer Flask เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 50 ˚C นาน 10 นาที นำสารที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง ล้างส่วนที่เหลือบนกระดาษกรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric Flask

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณน้ำตาล โดยดูดสารละลาย 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2.50 มิลลิลิตร และเติม DNS reagent 1.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 ˚C นาน 5 นาที จากนั้นจุ่มในน้ำเย็นทันที แล้วนำไปวัดค่า $A_{540}$ โดยเครื่อง Spectrophotometer

**2.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์** (James, 1995)

**สารเคมี**

สารเคมีที่ใช้เหมือนกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

**การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาล**

ใช้กราฟมาตรฐานเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด**

ชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดมาประมาณ 5 กรัม ใส่ใน Erlenmayer Flask เติมกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 100 ˚C นาน 20 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 % จำนวน 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง ล้างส่วนที่เหลือบนกระดาษกรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric Flask

นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปวัดหาปริมาณน้ำตาล โดยดูดสารละลาย 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2.75 มิลลิลิตร และเติม DNS reagent 1.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 ˚C นาน 5 นาที จากนั้นจุ่มในน้ำเย็นทันที แล้วนำไปวัดค่า $A_{540}$ โดยเครื่อง Spectrophotometer

**3. คุณภาพทางจุลชีววิทยา**

**3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด** (AOAC, 1998)

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างอาหารแข็ง 25 กรัมใส่ในถุง stomacher เติมสารละลาย 0.1% peptone water จำนวน 225 กรัม นำเข้าเครื่องตีป่น (stomacher) นาน 1-2 นาที ทำเจือจางอาหารในสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 มล. จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 3 ระดับความเข้มข้นที่ติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ โดยทำแบบ duplicate เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อุณหภูมิ 44-46 ˚C ประมาณ 12-15 มิลลิลิตรใส่ในจานเพาะเชื้อ เขย่าจานให้สารละลายอาหารกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นปล่อยให้อาหารวุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 35-37 ˚C นาน 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี บันทึกจำนวนโคโลนีที่นับได้ เพื่อใช้ในการคำนวณต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.2 ปริมาณยีสต์และรา** (AOAC, 1998)

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 25 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมสารละลาย 0.1 % peptone water ในอัตราส่วน 1:10 นำเข้าเครื่องตีป่น (stomacher) นาน 1-2 นาที ทำเจือจาง

อาหารในสารละลายเจือจาง หลอดละ 9 มล. จนได้ระดับความเจือจางที่ เหมาะสม 3 ระดับที่ติดกัน ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 3 ระดับความเข้มข้นที่ติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ โดยทำแบบ duplicate จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริค เข้มข้น 10% อุณหภูมิประมาณ 45 ˚C ปริมาณ 20-25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยหมุนในทิศตามเข็มนาฬิกาและทวนเข็มนาฬิกา ไม่ควรใช้เวลาในการเตรียมสารละลายอาหารจนถึงขั้นตอนการ pour plate นานเกิน 20 นาที บ่มเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 25 ˚C โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ และห้ามวางจานเพาะเชื้อซ้อนกันเกิน 3 จาน บ่มเพาะเชื้อนาน 5 วัน ห้ามเคลื่อนไหวจานเพาะเชื้อก่อนครบกำหนดระยะเวลาการบ่มเพาะ นับจำนวนโคโลนีของเชื้อในจานที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี บันทึกจำนวนโคโลนีที่นับได้ เพื่อใช้ในการคำนวณต่อไป

**ตอนที่ 2 ศึกษาคุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาของน้ำพริกหนุ่มและวัตถุดิบที่นำมาผลิตน้ำพริกหนุ่ม**

นำวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำพริกหนุ่มได้แก่ พริกเผา หอมเผา และกระเทียม มาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับตอนที่ 1 จำนวน 2 ซ้ำ และนำวัตถุดิบทั้งหมดมาทำการผลิตน้ำพริกหนุ่ม แล้วทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาเช่นเดียวกับตอนที่ 1 จำนวน 2 ซ้ำ

**การผลิตน้ำพริกหนุ่มพันธุ์จักรพรรดิ์**

วิธีการผลิตน้ำพริกหนุ่มพันธุ์จักรพรรดิ์มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (อรุณี, 2549)

นำวัตถุดิบได้แก่พริกหนุ่มพันธุ์จักรพรรดิ์, หอมแดง
และกระเทียมมาล้างให้สะอาด

↓

นำพริกหนุ่มมาอบในเตาอบอุณหภูมิ 150 ˚C เป็นเวลา 20 นาที

↓

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลอกเปลือกของพริกหนุ่มออกจากนั้นบรรจุไว้ในถุงพลาสติกเพื่อรอการผสม

↓

อบหอมในเตาอบ 150 °C เป็นเวลา 10 นาที

↓

ลวกกระเทียมในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที

↓

นำหอมและกระเทียมมาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น
จากนั้นเก็บไว้ในถุงพลาสติกเพื่อรอการผสม

↓

นำวัตถุดิบที่เตรียมไว้มาผสมในเครื่องผสมโดยมีอัตราส่วนดังนี้

| | |
|---|---|
| พริกหนุ่มอบ | 700 กรัม |
| หอมอบ | 100 กรัม |
| กระเทียม | 100 กรัม |
| น้ำปลา | 100 กรัม |
| เกลือป่น | 1 ช้อนโต๊ะ |

↓

ผสมจนส่วนผสมเข้ากันดี

↓

นำน้ำพริกหนุ่มที่ได้มาทำการบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่เตรียมไว้
จากนั้นนำไปถนอมโดยวิธีการต่างๆ แล้วเก็บรักษา
ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ตอนที่ 3 ศึกษาการถนอมน้ำพริกหนุ่มโดยวิธีการบรรจุสุญญากาศ**

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 7 factorial in CRD โดยนำน้ำพริกหนุ่มที่ผลิตจากวัตถุดิบในชุดเดียวกันมาทำการบรรจุแบบสุญญากาศ โดยบรรจุน้ำพริกหนุ่มในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือ ถุงสุญญากาศ (Nylon / LLDPE) และถุงสุญญากาศ (Aluminium foil) ปริมาณเท่ากันคือ 70 กรัม จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องบรรจุสุญญากาศเพื่อทำการบรรจุ แล้วทำการเก็บรักษาน้ำพริกหนุ่มที่ผ่านการบรรจุสุญญากาศในบรรจุภัณฑ์ทั้งสองแบบไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการสุ่มตัวอย่างมาตรวจทุกๆ วันที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 โดยทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา เช่นเดียวกับตอนที่ 1 จำนวน 2 ซ้ำ

**ตอนที่ 4 ศึกษาการถนอมน้ำพริกหนุ่มโดยกระบวนการความดันสูง**

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 x 7 factorial in CRD โดยนำน้ำพริกที่ผลิตจากวัตถุดิบในชุดเดียวกันมาทำการบรรจุในถุงพลาสติกแบบ Nylon/LLDPE ในปริมาณเท่ากันคือ 70 กรัม จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการความดันสูง ซึ่งใช้ระดับความดัน 2 ระดับ คือ 400 และ 600 MPa และระยะเวลาในการคงความดัน 2 ช่วง คือ 20 และ 40 นาที จากนั้นเก็บรักษาน้ำพริกหนุ่มทุกสิ่งทดลองไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการสุ่มตัวอย่างมาตรวจทุกๆ วันที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 โดยทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี กายภาพ และ จุลชีววิทยา เช่นเดียวกับตอนที่ 1 จำนวน 2 ซ้ำ

**3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล**

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved