บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลลิ้นจี่สดที่ใช้ในการทดลอง 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ฮงฮวย กิมเจง และจักรพรรดิ (รูปที่ 3.1) ที่ซื้อมาจากสวนเกษตรกรในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ และจากตลาดสวนบวกหาด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 และ 2551 เป็นผลลิ้นจี่ที่เก็บเกี่ยวในระยะสุกทางการค้า บรรจุในกล่องกระดาษและนำมาทดลองทันที หรือเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 4$\pm$1 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 วัน ก่อนนำมาทดลอง โดยนำผลลิ้นจี่มาเด็ดก้านออก และคัดเลือกเอาเฉพาะผลที่มีขนาดสม่ำเสมอกัน ไม่มีตำหนิ ไม่มีรอยแมลงกัด และไม่เน่าเสีย นำผลลิ้นจี่ทั้งหมดมาทดลองตามแผนการทดลอง

(ก) ผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

(ข) ผลลิ้นจี่พันธุ์กิมเจง

(ค) ผลลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิ

รูปที่ 3.1 ผลลิ้นจี่ทั้ง 3 พันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดลักษณะสัมผัสเนื้ออาหาร (Texture Analyzer; TA-XTi / 50, UK)
2. เครื่องวัดสี (Colorimeter; ColorQuestXE, HunterLab, USA)
3. เครื่องมือวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer; Model PR-101, Atago, Japan)
4. เครื่องวัดค่าพีเอช (Microprocessor pH meter; Consort, Belgium)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Model PB 1502-5, Mettler–Toledu, Swizerland)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Model AB204-S, Mettler–Toledu, Swizerland)
7. เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน (LD-816, Labinco BV, Netherlands)
8. ตู้เพาะเชื้อ (HF Safe 900/cf, Heal Force, China)
9. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator; FOC 225I, Velp Scientifica, Italy)
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ (MIR-553, Sanyo, Japan)
10. เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher; IVL Masticator 400, Spain)
11. เครื่องผสมสาร (Vortex, Genie-2, Scienitific Industries, USA)
12. หม้อนึ่งความดันอัดไอ (autoclave ; HL-341, Huxley, Taiwan)
13. เครื่องปั่นอาหาร (AW9, Moulinex, France)
14. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven ; EME2725S, Electrolux, Sweden)
15. มีดคว้านสเตนเลส
16. กล่องพลาสติกใสพอลิสไตรีนที่มีฝาปิด (polystyrene clamshell) ขนาด กว้าง 14 ซม. x ยาว 15 ซม. x สูง 8 ซม.
17. ถุงพอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) ขนาด 7x9 นิ้ว หนา 0.5 มิลลิเมตร ผลิตโดย บริษัท ไพรซ์อินเตอร์แพค (1999) จำกัด

3.3 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมี

1. กรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid; Asia Pacific Chemicals, Australia)
2. กรดซิตริก (Citric acid; Ajax Finechem, New Zealand)
3. กรดออกซาลิก (Oxalic acid; Ajax Finechem, New Zealand)
4. กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid; Ajax Finechem, New Zealand)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, Merck, Germany)
7. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate; Scharlau, Spain)
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate; Scharlau, Spain)
9. 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-Dichlorophenol-indophenol; Merck, Germany)
10. สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน 4.0, 7.0 และ 10.0 (Buffer solution, Merck, Germany)
11. กรดเพอร์ออกซีแอซีติก (Peroxyacetic acid; Thaiperoxide co, Ltd, Thailand)
12. กรดเพอร์ออกซีซิตริก (Peroxycitric acid; Thaiperoxide co, Ltd, Thailand)
13. โซเดียมไฮไพคลอไรต์ 5.7% (Sodium hypochlorite; Clorox, USA)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด (Plate count agar; Difco, France)
15. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์และรา (Potato dextrose agar; Difco, France)
16. เอทิลแอลกอฮอล์ 95% (Ethyl alcohol 95%, โอวี เคมิเคิล แอนด์ซัพพลาย, Thailand)

วิธีการเตรียมสารฆ่าเชื้อสำหรับล้างผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สด

ก) สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์จากโซเดียมไฮโพคลอไรต์ทางการค้าความเข้มข้น 5.7% โดยนำโซเดียมไฮโพคลอไรต์ปริมาตร 0.88 และ 3.52 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำประปาและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าพีเอชด้วยกรดซิตริกความเข้มข้น 50% จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.7 จะได้สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ความเข้มข้น 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ข) สารละลายเพอร์ออกซีแอซีติกความเข้มข้น 50, 75, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกจากกรดเพอร์ออกซีแอซีติกทางการค้าความเข้มข้น 5% โดยนำกรดกรดเพอร์ออกซีแอซีติกปริมาตร 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำประปาและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกความเข้มข้น 50, 75, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ค) สารละลายเพอร์ออกซีซิตริกความเข้มข้น 50, 75, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

เตรียมสารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริกจากกรดเพอร์ออกซีซิตริกทางการค้าความเข้มข้น 5% โดยนำกรดกรดเพอร์ออกซีซิตริกปริมาตร 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 และ 4.0 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำประปาและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริกความเข้มข้น 50, 75, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

ก) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1% เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตและโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอย่างละ 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยเติมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจน-ฟอสเฟตลงในสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จนกระทั่งค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 7.2 ปิเปตต์สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใส่ในหลอดทดลอง 9.0 มิลลิลิตรต่อหลอด (สำหรับใช้ในการเจือจางตัวอย่าง) หรือตวงใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 50 และ 90 มิลลิลิตร (สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

ข) สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10% เตรียมโดยชั่งกรดทาร์ทาริก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เทใส่ขวดแก้วทนความร้อน ปิดฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

ค) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียทั้งหมด (Plate count agar ; PCA) เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA จำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย เทใส่ขวดแก้วทนความร้อน ปิดฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีค่าพีเอชที่วัดได้ประมาณ 7.0$\pm$0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ง) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์และรา (Potato dextrose agar ; PDA) เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 39.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย เทใส่ขวดแก้วทนความร้อน ปิดฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในเครื่องนึ่งความดันอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีค่าพีเอชที่วัดได้ประมาณ 5.6$\pm$0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

ก) สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่างมาตรฐาน

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี

ก) กรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4% เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิกจำนวน 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ข) 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04% เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโร-ฟีนอลอินโดฟีนอล จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิตู้เย็น

ค) สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ชั่งกรดแอสคอร์บิกจำนวน 0.05 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4% แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน 10 มิลลิลิตร ไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04% จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตรสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี (Ranganna,1986)

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของกรดเพอร์ออกซีแอซีติกและกรดเพอร์ออกซีซิตริก และระยะเวลาในการจุ่มผลลิ้นจี่ในสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิดที่เหมาะสมในการลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สด

ผลลิ้นจี่สด

สำหรับสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิด จะวางแผนการทดลองแบบ 4x3 factorial in CRD กำหนดปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้น 4 ระดับ และเวลาในการจุ่มผลลิ้นจี่ในสารฆ่าเชื้อ 3 ระดับ ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้น : 75, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 เวลาในการจุ่มผลลิ้นจี่ในฆ่าเชื้อ : 1, 3 และ 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื้อลิ้นจี่สด

สำหรับสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิด จะวางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial in CRD กำหนดปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้น 2 ระดับ และเวลาในการจุ่มเนื้อลิ้นจี่ในสารฆ่าเชื้อ 2 ระดับ ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้น : 50 และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 เวลาในการจุ่มเนื้อลิ้นจี่ในสารฆ่าเชื้อ : 1 และ 3 นาที

จุ่มผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดในสารฆ่าเชื้อดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 4$\pm$1 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่ได้จุ่มน้ำ และชุดทดลองที่จุ่มในน้ำประปา ปล่อยให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดมาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (BAM, 2001) และยีสต์รา (AOAC, 2000) โดยสุ่มตัวอย่างผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดมาสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ผล และทำการทดลองซ้ำโดยใช้ผลลิ้นจี่จากแหล่งต่างกันรวม 3 ครั้ง

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

การเตรียมตัวอย่าง

ก) ผลลิ้นจี่สด เตรียมโดยนำตัวอย่างผลลิ้นจี่จำนวน 5 ผล ที่จุ่มในสารฆ่าเชื้อแล้วใส่ในถุงพลาสติกพอลิโพรพิลีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลาย 0.1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร ใช้มือถูผลลิ้นจี่ด้านนอกถุงอย่างเบาๆ เป็นเวลา 2 นาที สารละลายตัวอย่างที่ได้ให้นำมาเจือจาง โดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร จะได้เป็น 1 ระดับความเจือจาง ทำการเจือจางเช่นนี้จนถึงระดับที่เหมาะสม คือ 1:1000 (10^{-3})

ข) เนื้อลิ้นจี่สด เตรียมโดยใช้คีมและกรรไกรเหล็กปลอดสนิม (stainless steel) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบและตัดตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาจำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกพอลิโพรพิลีนที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่มีสารละลาย 0.1% ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 90 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่สดที่เจือจาง 1:10 (10^{-1}) จากตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่สดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จะได้ตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่สดที่เจือจาง 1:100 (10^{-2})

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (BAM, 2001) โดยวิธี spread plate

เทอาหาร PCA ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ทำกลุ่มละ 3 จาน ปล่อยวางจานอาหารวุ้นไว้ 1 คืนก่อนนำมาสเปรดเพลต ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่เจือจางในระดับต่างๆ ที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตรงกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้ว spreader ที่ฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์และลนไฟ ปล่อยให้แท่งแก้วเย็นลงแล้วเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้า ปิดฝาและวางไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปในวุ้น ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในหน่วยโคโลนีต่อผลลิ้นจี่ (cfu/ผลลิ้นจี่) สำหรับผลลิ้นจี่สด หรือโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (cfu/g) สำหรับเนื้อลิ้นจี่สด วิธีการรายงานผลจำนวนโคโลนีแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นคำนวณให้อยู่ในรูปลอการิทึมฐาน 10 ($\log_{10}$)

การตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2000) โดยวิธี spread plate

เทอาหาร PDA ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดทาร์ทาริก 10% ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร/100 มิลลิลิตร ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.5 ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ทำกลุ่มละ 3 จาน วางจานอาหารวุ้นไว้ 1 คืนก่อนนำมาสเปรดเพลต ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตรงกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้ว spreader ที่ฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์และลนไฟ ปล่อยให้แท่งแก้วเย็นลงแล้วแล้วเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้า ปิดฝาและวางไว้เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อให้สารละลายซึมเข้าไปในวุ้น ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทั้ง 3 จานเพาะเชื้อ รายงานผลการตรวจนับในหน่วยโคโลนีต่อผลลิ้นจี่ (cfu/ผลลิ้นจี่) สำหรับผลลิ้นจี่สด หรือโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (cfu/g) สำหรับเนื้อลิ้นจี่สด วิธีการรายงานผลจำนวนโคโลนีแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นคำนวณให้อยู่ในรูปลอการิทึมฐาน 10 ($\log_{10}$)

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในเปลือกผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สด

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกและสารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริกจากการทดลองที่ 1 แล้ว จึงนำสารฆ่าเชื้อที่เหมาะสมมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารฆ่าเชื้อที่ใช้ในทางการค้าคือ สารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Clorox®) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีสิ่งทดลองทั้งหมด 5 สิ่งทดลอง ได้แก่

สิ่งทดลองที่ 1 ไม่จุ่มน้ำ (ชุดควบคุม)

สิ่งทดลองที่ 2 จุ่มในน้ำประปา (ชุดควบคุม)

สิ่งทดลองที่ 3 จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก (PAA) ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมสำหรับผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สด ที่ได้จากการทดลองที่ 1

สิ่งทดลองที่ 4 จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริก (PCA) ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมสำหรับผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สด ที่ได้จากการทดลองที่ 1

สิ่งทดลองที่ 5 จุ่มในสารละลายโซเดียมไฮโพคลอไรต์ (NaOCl)
ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 นาที ในผลลิ้นจี่ (USFDA, 2006)
และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 นาที ในเนื้อลิ้นจี่สด (USFDA, 2006)

จุ่มผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดในสารฆ่าเชื้อแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส ปล่อยให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดมาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (BAM, 2001) และยีสต์รา (AOAC, 2000) โดยสุ่มตัวอย่างผลลิ้นจี่และเนื้อลิ้นจี่สดมาทั้ง 5 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ผล และทำการทดลองซ้ำโดยใช้ผลลิ้นจี่จากแหล่งต่างกันรวม 3 ครั้ง

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

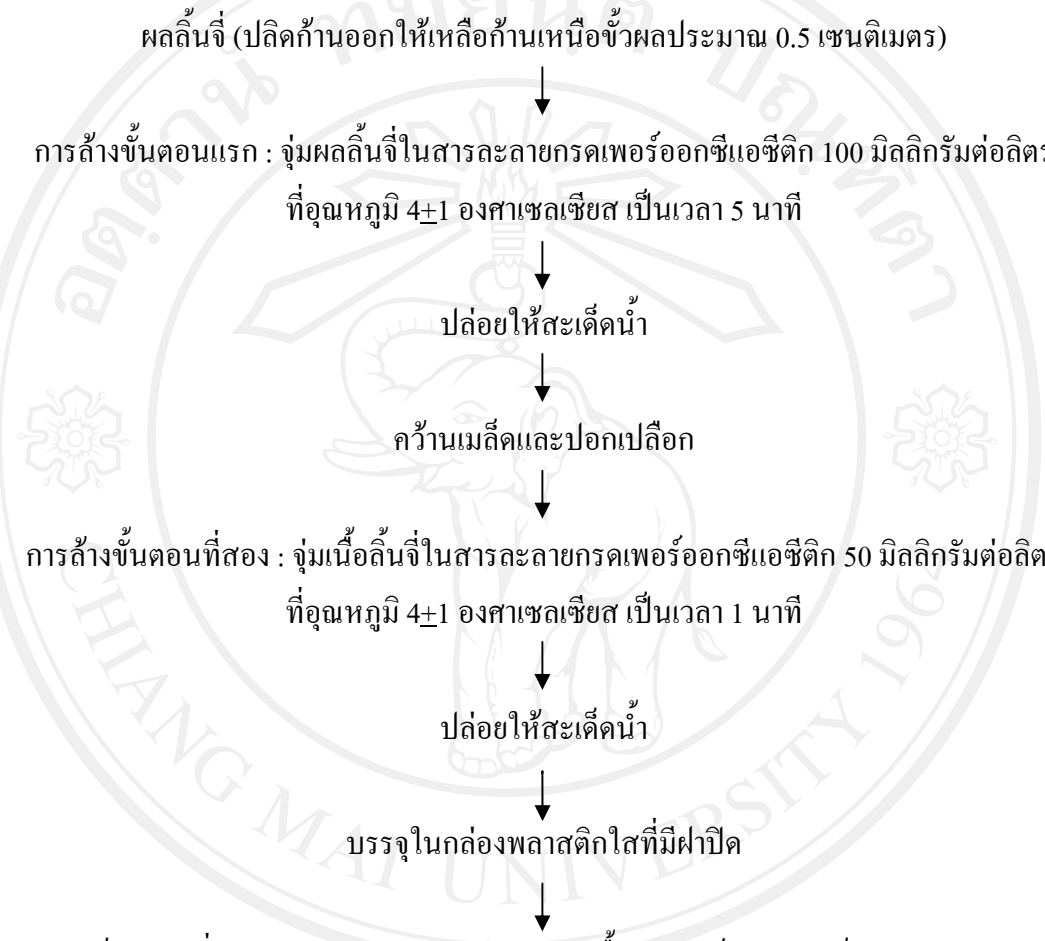
การทดลองที่ 3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ระหว่างการเก็บรักษาเนื้อลิ้นจี่สด

เมื่อได้ชนิดของสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกผลลิ้นจี่ และเนื้อลิ้นจี่สดจากการทดลองที่ 1 และ 2 แล้ว จึงทำการทดลองอีกครั้ง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ระหว่างการเก็บรักษาเนื้อลิ้นจี่สด

จุ่มผลลิ้นจี่ในสารละลายที่ความเข้มข้น และระยะเวลาดังกล่าว ปริมาตรสารละลาย 1 ลิตรต่อผลลิ้นจี่ 30 ผล ที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นคว้านเมล็ดลิ้นจี่ออกด้วยมีดคว้านเหล็กปลอดสนิมที่มีปลายแหลมคม ปอกเปลือก และนำเนื้อลิ้นจี่มาจุ่มในสารฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ให้ผลดีจากการทดลองที่ 1 และ 2 ปล่อยให้สะเด็ดน้ำ บรรจุเนื้อลิ้นจี่ลงในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิด จำนวน 15 ชิ้นต่อกล่อง เก็บรักษาที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมี ในวันเริ่มต้น และระหว่างการเก็บรักษาทุกๆ 3 วัน โดยขั้นตอนการแปรรูปเนื้อลิ้นจี่สดพร้อมบริโภคแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 กระบวนการแปรรูปเนื้อลิ้นจี่สดพร้อมบริโภค

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (BAM, 2001) และยีสต์รา (AOAC, 2000) โดยวิธี spread plate ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ก. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ทำโดยชั่งน้ำหนักเนื้อลิ้นจี่ที่บรรจุอยู่ในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดทุกๆ 3 วัน ด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Model PB 1502-5, Mettler–Toledu, Swizerland) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{(น้ำหนักวันเริ่มต้น – น้ำหนัก ณ วันที่ชั่ง)}}{\text{น้ำหนักวันเริ่มต้น}} \times 100$$

ข. ปริมาณของเหลวที่ไหลออกมา (juice leakage)

การวิเคราะห์ปริมาณของเหลวที่ไหลออกมาโดยใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ดูดของเหลวที่อยู่ก้นภาชนะออกมา และรายงานผลเป็นหน่วย มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 15 ผล

ค. การวัดสี

วัดสีเนื้อลิ้นจี่ด้านนอกชิ้นละ 2 จุด โดยใช้เนื้อลิ้นจี่ 5 ผลต่อซ้ำ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เครื่อง Colorimeter (ColorQuestXE, HunterLab, USA) บันทึกค่าในระบบ CIE ซึ่งแสดงค่าเป็น L*, a* และ b* เมื่อ L = the lightness factor (value) และ a*, b* = the chromaticity coordinates

L* = The lightness factor value

ถ้าค่า L* เท่ากับ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีขาว และถ้าค่า L* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

a* = เป็นค่าแสดงสีแดงและสีเขียวของวัตถุ

ถ้าค่า a* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีเขียว

b* = เป็นค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงินของวัตถุ

ถ้าค่า b* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง ถ้าค่า b* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน

ถ้าค่า ทั้ง a* และ b* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

เนื่องจากเนื้อลิ้นจี่มีสีขาว จึงรายงานผลเป็นค่า L* เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ง. วัดความแน่นเนื้อ

วัดค่าความแน่นเนื้อของเนื้อลิ้นจี่สดโดยใช้เครื่อง Texture Analyzer (TA-XTi / 50, UK) ใช้หัวรูปทรงกระบอกปลายแหลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร (P/2N cylindrical probe) ด้วยความเร็ว (test speed) 5 มิลลิเมตรต่อวินาที นำเนื้อลิ้นจี่ 15 ผล มาผ่าตามยาวครึ่งผล วัดค่าความแน่นเนื้อของตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่จำนวน 30 ชิ้น ทำการวัด 3 ซ้ำ โดยใช้ตัวอย่าง 10 ชิ้นต่อ 1 ซ้ำ ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น นิวตัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

ก. ค่าพีเอช (pH)

หลักการ การวัดค่าพีเอชเป็นการวัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายใดๆ ซึ่งค่าพีเอชจะผันแปรตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่มีอยู่ในสารละลายนั้น (นิธิยา, 2549)

$$pH = - \log[H^+]$$ เมื่อ $[H^+]$ คือความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน

เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชจะลดลง

นำเนื้อผลลิ้นจี่ 5 ผลต่อซ้ำ ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่น (Mulinex, France) ชั่งตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มา 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH meter (Consort, Belgium) และก่อนใช้เครื่องวัดค่าพีเอชทุกครั้งจะต้องผ่านการปรับค่ามาตรฐานโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน 4.0, 7.0 และ 10.0 ตามลำดับ ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง (triplicate with triplicate determination) บันทึกผลการทดลองที่ได้ แล้วหาค่าเฉลี่ย

ข. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS)

หลักการ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด หมายถึง ปริมาณของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ คือ น้ำ ของแข็งที่ละลายน้ำได้ซึ่งมักจะเป็นน้ำตาลและกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งกรดแอมิโนและกรดแอสคอร์บิกด้วย (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

นำน้ำปั่นที่ได้จากข้อ 1 มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ Digital refractometer (Model PR-101, Atago, Japan) ที่อ่านค่าได้ระหว่าง 0-45% โดยก่อนใช้เครื่องมือทุกครั้งได้ปรับค่าให้เป็น 0 ด้วยน้ำกลั่น และวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (TA)

หลักการ การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ โดยการนำน้ำคั้นตัวอย่างที่มีจำนวนแน่นอนมาไทเทรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน จนถึงจุดยุติ (end point) โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ หรือวัดค่าพีเอช (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจากข้อ 1 จำนวน 1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำกลั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า นำสารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล วัดค่าพีเอชของสารละลายที่ไทเทรตได้จนได้ค่าพีเอช 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างที่ใช้ทำการวิเคราะห์ตังอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดมาลิก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดย milliequivalent weight of malic acid = 0.067

1 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดมาลิก 0.067 กรัม (Ranganna, 1986)

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดที่ไทเทรตได้} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N) x ปริมาตร NaOH (ml) x 0.067 x 100}}{\text{น้ำหนักของเนื้อลิ้นจี่ (g)}}$$

ง. อัตราส่วน TSS/TA

อัตราส่วน TSS/TA คำนวณได้โดย

$$\text{TSS/TA} = \frac{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS)}}{\text{ปริมาณกรดทั้งหมดที่คำนวณได้ (TA)}}$$

จ. ปริมาณวิตามินซี

หลักการ วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (ไม่มีสี) จะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันกับ indophenol dye คือ 2,6-dichlorophenol-indophenol (สีน้ำเงินเข้ม) ได้เป็นสารละลายที่ไม่มีสี เมื่อถึงจุดยุติที่มี dye มากเกินพอ (end point unreduced dye) dye จะเป็นสีชมพูในสารละลายกรด ซึ่งสารละลายกรดออกซาลิกจะรักษาสภาพให้เป็นกรด และหลีกเลี่ยงการเกิด auto-oxidation ของกรดแอสคอร์บิกที่ค่าพีเอชสูง (Ranganna, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจากข้อ 1 มา 10 กรัม แล้วเติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรของเหลวเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มา 10 มิลลิลิตร ไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลความเข้มข้น 0.4% จนถึงจุดยุติ ซึ่งจะทำให้สารละลายมีสีชมพูคงตัวอยู่ประมาณ 15 วินาที ทำการไทเทรตตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย คำนวณหาปริมาณวิตามินซี โดยใช้ปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่ใช้ไปเปรียบเทียบกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน โดยมีวิธีคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณวิตามินซี} = \frac{a \times 0.001 \times 100 \times 1000}{b \times c}$$

a = ปริมาณ2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่ใช้ไทเทรตกับสารละลายตัวอย่าง

b = ปริมาณ2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่ใช้ไทเทรตกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน

c = ปริมาณสารตัวอย่าง (กรัม)

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วย Hedonic nine point scale ใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 15 คน ทำการทดสอบชิมและให้คะแนนความชอบในลักษณะต่างๆ ได้แก่ สี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่น และการยอมรับโดยรวม โดยทำการทดสอบในวันเริ่มต้นและวันที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของการเก็บรักษา จนตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่สดพร้อมบริโภคได้คะแนนเฉลี่ยในลักษณะต่างๆ น้อยกว่า 5 คะแนน จึงสิ้นสุดการทดสอบทางประสาทสัมผัสและถือว่าไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา โดยแบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อลิ้นจี่สดพร้อมบริโภคแสดงในภาคผนวก ข แล้วนำผลการทดสอบที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.13

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SPSS V.13 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

สถานที่ปฏิบัติงานวิจัย ได้แก่ ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร และห้องปฏิบัติการของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัย เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved