บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (*Litchi chinensis* Sonn., cv. Hong Huay) ที่มีความสุกเต็มที่ สีเปลือกแดงจัด เกรดเอ สดปราศจากการเน่าเสีย จากตลาด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และลิ้นจี่จากโครงการ The uplands program, University of Hohenheim ในช่วงเดือน พฤษภาคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 255 1 และเดือน พฤษภาคม ถึงมิถุนายน พ.ศ. 2552 และนำมาทำการทดลองที่ สาขา วิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 เครื่องมือและสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ

1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (US-Vis Spectrophotometer, Model V-530, Perkinelmer)
2) เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuger, Hettich Zentrifugen : Rotina 46R, Germany)
3) เครื่องวัดสี Chromameter (Minolta CR-300, Japan)
4) เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Hanna : 213, U.S.A.)
5) เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water activity meter, Aqua Lab : model series 3, Decagon Device Inc., USA)
6) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, Dielhemim : HF-3000G, Switzerland)
7) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorius : A120S, Germany)
8) เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, National : NN-K652, Japan)
9) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Hirayama : HA-300MIV, Japan)
10) ตู้บ่ม (Incubator, Heraeus : B6200, England)
11) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert : UM100-UM800, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)
13) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer, Atago : N-1E Brix 0-32%, Japan)
14) เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and magnetic stirrer, Whatman : HPMS, England)
15) เครื่องตีป่น (Laboratory blender stomacher, Seward Chemical : 400, England)
16) เครื่องปั่นผสม (Vortex, Scientific Industries : G-560E, U.S.A.)
17) เครื่องปั่น (Blender, Imarflex : IF-308, Thailand)
18) เครื่องบรรจุไนโตรเจน (HFE vacuum systems bv, 5215 ML ‘s-Hertogenbosch, The Netherlands)
19) เครื่องแช่ในสภาวะสุญญากาศ (Vacuum oven, Shel lab, U.S.A.)
20) ถุงอลูมิเนียมฟอยด์ (OPP/PE/AL/LLDPE) ขนาด 7x10 นิ้ว (สยามแพค, เชียงใหม่)
21) ถุงลามิเนต (Nylon/LLDPE) ขนาด 5x8 นิ้ว (สยามแพค, เชียงใหม่)
22) โถดูดความชื้น (Desiccator)
23) เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray dryer, Model 160x180x200, Navaloy, Thailand)
24) ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม

3.2.2 สารเคมี

1) 4-เฮกซิลรีซอลชินอล (4-hexylresorcinol, $C_{12}H_8O_2$, AR Grade, SIGMA, USA)
2) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, $C_6H_8O_6$, Food grade, Lab P&P, Thailand)
3) กรดซิตริก (citric acid, $C_6H_{10}O_8$, Food grade, Lab P&P, Thailand)
4) กรดซอร์บิก (sorbic acid, C_5H_7COOH, Food grade, Lab P&P, Thailand)
5) แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride, $CaCl_2$, Food grade, S.K.Trading, Thailand)
6) คาราจีแนน (carrageenan, Food grade, O.V. Chemical & supply, Thailand)
7) มอลโตเด็กซ์ตริน (maltodextrin DE-10, Food grade, O.V. Chemical & supply, Thailand)
8) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite, $Na_2S_2O_5$, Food grade, Lab P&P, Thailand)
9) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH, AR Grade, E.Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10) โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรท (sodium dihydrogen phosphate, NaH_2PO_4, AR Grade, Ajax Finechem)
11) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท (disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4, AR Grade, Ajax Finechem)
12) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl, AR Grade, E. Merck Germany)
13) โซเดียมอะซีเตตแอนไฮดรัส (Sodium acetate anhydrous, CH_3COONa, AR Grade, Ajax Finechem)
14) กรดอะซีติก (acetic acid, CH_3COOH, AR Grade, E.Merck, Germany)
15) กัวอะคอล (guaiacol, $C_7H_8O_2$, AR Grade, E.Merck, Germany)
16) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2, AR Grade, E.Merck, Germany)
17) ไพโรแคทิคอล (pyrocatechol, $C_6H_6O_6$, AR Grade, Fluka, Switzerland)
18) Maximum recovery diluent (MRD, E. Merck, Germany)
19) อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด (plate count agar, Himedia, India)
20) อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา (potato dextrose agar, Himedia, India)
21) กรดทาร์ทาริก (tartaric acid, $HOOC(CHOH)_2COOH$, Carlo Erba Reagent, Germany)
22) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate, $C_4O_6H_4NaK.4H_2O$, Carlo Erba Reagent, Germany)
23) กรดซัลฟูริก (H_2SO_4, AR Grade, Lab-Scan, Thailand)
24) กรด 3,5 – ไดไนโตรซาลิคไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid, $C_7H_4N_2O_7$, AR Grade, Fluka, Switzerland)
25) โซเดียมไฮโดรเจนซัลไฟต์ (sodium hydrogen sulfite, $NaHSO_3$, AR Grade, Fluka, Switzerland)
26) กลูโคสมาตรฐาน (standard glucose, $C_6H_{12}O_6$, AR Grade, Ajax Finechem)
27) น้ำกลั่น (distillation water)
28) น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ (ตรามิตรผล ประเทศไทย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบ

ผลลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (*Litchi chinensis* Sonn., cv. Hong Huay) ที่มีความสุกเต็มที่ สีเปลือกแดงจัด สดปราศจากการเน่าเสีย นำมาล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาด คว้านเอาเมล็ดออกด้วยที่คว้านเมล็ด (ตุ๊ดตู่) จนได้ปริมาณมากพอจึงแกะเปลือกออก นำเนื้อลิ้นจี่แช่ในสารละลาย ที่มีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ดัดแปลงมาจากวิธีของ รัตนาและนิธิยา (2546)

งานวิจัยนี้แบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 คัดเลือกสารทดแทนซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย ก่อนนำไปอบแห้ง

นำเนื้อลิ้นจี่ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบมาแช่ในสารละลาย วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely randomized design) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ สภาวะการทดลองที่ใช้ในการแช่เนื้อลิ้นจี่ ดังนี้คือ

ชุดควบคุม เนื้อลิ้นจี่ที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย

ชุดการทดลองที่ 1 0.2% citric acid, 0.15%sorbic acid, 0.02% 4-hexylresorcinol, 0.25% ascorbic acid และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 52 บริกซ์ ด้วยซูโครส แช่เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 4 (Gonzalez *et al*., 1993)

ชุดการทดลองที่ 2 0.5%calcium chloride, 1% ascorbic acid แช่เป็นเวลา 3 นาที อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 5 (Ponting *et al*., 1972)

ชุดการทดลองที่ 3 0.5%carageenan, 0.5% citric acid แช่เป็นเวลา 10 นาที อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 1 (Tong and Hicks., 1991)

ชุดการทดลองที่ 4 10% maltodextrin, 0.2% citric acid แช่เป็นเวลา 10 นาที อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 1 (Xu *et al*., 1993)

ชุดการทดลองที่ 5 sodium metabisulfite 2000 ppm แช่เป็นเวลา 1.5 นาที อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 1 (Santerre et al., 1991)

ชุดการทดลองที่ 6 70% sucrose, 0.4% sodium metabisulfite แช่เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างผลไม้ : สารละลายเท่ากับ 1 : 1.5 (วัฒนา, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังการแช่สารละลายนำเนื้อลิ้นจี่มาบรรจุในถุงลามิเนต (Nylon/LLDPE) ขนาด 5x8 นิ้ว และเก็บที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ผลโดยสุ่มตัวอย่างออกมาวัดค่าสี และกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Flurkey and Jen (1978) เก็บตัวอย่างทุกๆ 60 นาที ดังนี้คือ ที่เวลา 0, 60, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งได้ และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) เลือกชุดการทดลองที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด

- **การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ**

ก. การวัดสี วัดสีเนื้อ ลิ้นจี่ด้วยเครื่องวัดสี Chromameter (Minolta CR-300, Japan) (ภาคผนวก ข)

- **การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมี**

ก. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่มาวิเคราะห์ ตามวิธีของ Flurkey and Jen (1978) (ภาคผนวก ค)

ข. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่มาวิเคราะห์ ตามวิธีของ Flurkey and Jen (1978) (ภาคผนวก ค)

ตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการแช่เนื้อลิ้นจี่ในสารละลายที่เหมาะสม

เปรียบเทียบวิธีการแช่เนื้อลิ้นจี่ที่เหมาะสมโดยเลือกใช้สารละลายที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลจากตอนที่ 1 จำนวน 2 ชนิด และวิธีแช่สารละลาย 3 วิธีได้แก่

วิธีที่ 1 การแช่ในสารละลายที่ความดันปกติ โดยนำเนื้อลิ้นจี่ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ แช่ในสารละลายภายใต้ความดันปกติที่อุณหภูมิห้องตามเวลาในตอนที่ 1

วิธีที่ 2 การแช่ในสภาวะสุญญากาศที่ระดับ 50 มิลลิเมตรปรอทตามเวลาในตอนที่ 1 โดยนำเนื้อลิ้นจี่ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบแช่ในสารละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Vacuum oven, Shel lab, U.S.A.) หลังจากนั้นกลับสู่สภาวะปกติที่ความดันบรรยากาศ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Xie (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 3 การแช่ในสภาวะสุญญากาศที่ระดับ 50 มิลลิเมตรปรอท ตามเวลา 2 เท่าของตอนที่ 1 นำเนื้อลิ้นจี่ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบแช่ในสารละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ (Vacuum oven, Shel lab, U.S.A.) หลังจากนั้นกลับสู่สภาวะปกติที่ความดันบรรยากาศ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Xie (2004)

- **การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ**

  ก. การวัดสี นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมี**

  ก. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

  ข. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่ มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี**

  ก. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter, Hanna : 213, USA)

  ข. การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้ Hand refractometer

ตอนที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นของสารทดแทนซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยก่อนและหลังการอบแห้ง

นำผลจากตอนที่ 2 มากำหนดแผนการทดลองโดยใช้ Factorial in CRD โดยกำหนดระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด 2 ระดับ ในสารละลายที่ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล และชุดควบคุม คือสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ร้อยละ 0.2 (รัตนาและนิธิยา, 2546) จากนั้นนำมาอบแห้ง โดยสุ่มตัวอย่าง เนื้อลิ้นจี่ ก่อนและหลังการอบแห้งมาเปรียบเทียบความแตกต่างทางกายภาพ ชีวเคมี และเคมี

- **การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ**

  ก. การวัดสี นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมี**

  ก. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่ มาวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี**

  ก. การวัดปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC(2000) : Method 934.06

  ข. **การวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (a_w)** โดยใช้เครื่อง Water activity meter (Aqua Lab : model series 3, Decagon Device Inc., USA)

ตอนที่ 4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ชีวเคมี เคมี และจุลินทรีย์ของเนื้อลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยอบแห้งในระหว่างการเก็บรักษา

นำเนื้อลิ้นจี่ที่ผ่านการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลโดยวิธีที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 3 มาอบแห้งแล้วบรรจุในถุง Aluminium foil (OPP/PE/AL/LLDPE) ที่มีความหนา 260 gauge (0.09 มิลลิเมตร)ในสภาวะที่มีการอัดก๊าซไนโตรเจน โดยเครื่องบรรจุไนโตรเจนอัตโนมัติ (HFE vacuum systems bv, 5215 ML 's-Hertogenbosch, The Netherlands) อัตราการไหล 20 ลิตรต่อนาที (Sagar and Khurdiya, 1999) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ชีวเคมี เคมี และจุลินทรีย์ของลิ้นจี่อบแห้งในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส 22 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 2 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างลิ้นจี่อบแห้งมาวิเคราะห์ทางกายภาพ ชีวเคมี และเคมีทุกๆ 2 สัปดาห์ ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสและวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ทุกๆ 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

- **การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ**

  ก. การวัดสี นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมี**

  ก. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 1

  ข. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส นำตัวอย่างเนื้อ ลิ้นจี่ มาวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

- **การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี**

  ก. การวัดปริมาณความชื้น นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 3

  ข. การวัดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (a_w) นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค. การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่มาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับตอนที่ 2

ง. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงและน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีของ James (1995)

- **การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์**

  ก. การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

  ข. การตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (Yeast and mold) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

- **ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส**

ได้แก่ ลักษณะปรากฏภายนอก คือ สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scaling test วางแผนการทดลองแบบ RCBD ใช้จำนวนผู้บริโภคในการทดสอบ 50 คน (trained panel)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved