บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. วัสดุพันธุ์พืช ผักกาดหอมห่อ (*Lactuca sativa* L.) ชั้นมาตรฐาน U มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-15 เซนติเมตร จากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย จังหวัดเชียงใหม่ ส่งมาที่งานคัดบรรจุเชียงใหม่ มูลนิธิโครงการหลวงภายในคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยรถขนส่งของมูลนิธิโครงการหลวง คัดเลือกเฉพาะหัวที่มีคุณภาพดี (ภาพที่ 3.1) นำมาทดลองทันที

2. การเตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

นำผักกาดหอมห่อมาล้างด้วยน้ำสะอาด แกะใบชั้นนอก 2-3 ใบ ออกทิ้ง หั่นชิ้นตามความยาวของก้านใบให้มีขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.2) แยกเอาส่วนที่เป็นใจกลางผักทิ้ง เนื่องจากเป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ มีอัตราการหายใจสูงกว่าปรกติ

3. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

1. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) รุ่น N 1 ของบริษัท ATAGO, Japan อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-32 องศาบริกซ์ ($^{\circ}$Brix)
2. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA 3100P ของบริษัท Sartorius, Germany
3. เครื่องปั่น (Blender) รุ่น S(643) ของบริษัท Hanma, Thailand
4. เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน รุ่น ME-20 ของบริษัท Aris, Thailand
5. Water bath รุ่น WB 10 ของบริษัท Memmert, Germany
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic-20 ของบริษัท Spectronic Instruments, U.S.A.
7. กระดาษกรอง Whatman No. 1
8. เครื่องวัดสี (Chromameter) รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta, Japan
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงปรับอุณหภูมิต่ำ (High refrigerate speed centrifuge and accessories) รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, Germany
10. UV-Visible Spectophotometer (Unicam UV Series 500, England)
11. ถุงโพลีโพรไพลีนที่มีความหนา 40 และ 50 ไมครอน แบบมีแถบกาวฝาปิด ของบริษัท เวิลด์ แพคเกจจิ้ง อินดัสตรี้ จำกัด 35/51-52 ถ. สะแกงาม แขวงแสมดำ เขตบางขุนเทียน กรุงเทพ ฯ 10150
12. ตู้เย็นแช่น้ำผลไม้ประตูกระจกใส รุ่น LC 203 LD ของบริษัท ฟรีเซอร์ (ไทยแลนด์) จำกัด 3/15 หมู่ 3 ซ. ร่วมมิตร ถ.ติวานนท์ ต.บ้านใหม่ อ.ปากเกร็ด จ. นนทบุรี 11120.
13. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH Meter, HANNA Instruments HI 9021 Microprocesser)

ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะทางกายภาพของผักกาดหอมห่อก่อนนำมาทดลอง

ภาพที่ 3.2 ลักษณะผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

14. มีดสแตนเลส และเขียง
15. ปากคีบสแตนเลส
16. ช้อนตักสารเคมี
17. ตู้อบเพาะเชื้อ รุ่น MIR-553 ของบริษัท Thanes development, Japan
18. ตู้ UV เขี่ยเชื้อ ของบริษัท Email westing house Pty Ltd., Australia
19. Gas chromatography รุ่น TRACE GC 2000 ของบริษัท Thermo Finnigan Italia S.p.A., Milan Italy
20. เครื่องเขย่า รุ่น Vortex-Genie 2 ของบริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
21. หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ ของบริษัท Gemmy Industrial corp, Taiwan
22. เทอร์โมมิเตอร์
23. Suction pump
24. เครื่องเหวี่ยงแยกน้ำส่วนเกินออกจากผิวนอกของชิ้นผัก (Press to spin, Salad spinner, Capacity 5.6 Ltrs, Thailand)
25. โกร่งบด
26. เครื่องแก้ว
    - บีกเกอร์
    - ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
    - ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
    - กระบอกตวง
    - ปิเปต
    - กรวยกรอง
    - แท่งแก้วคนสารละลาย
    - จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
    - หลอดแก้วฝาเกลียวทนความร้อน

4. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายสำหรับแช่ผักกาดหอมห่อ

- Sodium hypochlorite 10 % (Commercial grade, Instrument Lab, Thailand)
- Citric acid (AR Grade, UNIVER, APS AJAX Finechem, Australia)
- Acetic acid (AR Grade, J.T. Baker, U.S.A.)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial count)

- Ethanol 75 % (Commercial grade, Instrument Lab, Thailand)

- Sodium chloride (GR Grade, Merck, Germany)
- Peptone (Himedia Laboratories Limited, Munbai – 400 086, India)
- Standard Method Agar (Bacton Dickinson and Company Cockeysville, MD 21030, U.S.A.)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- Oxalic acid (AR Grade, UNIVER, APS AJAX Finechem, Australia)
- 2,6-dichlorophenol indophenol (AR Grade, AJAX Laboratory Chemicals, Australia)
- L(+)-ascorbic acid (Pro analysis, Merck, Germany)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- Acetone (BDH Laboratory Supplies Poole, BH 15 1TD, England)

สารเคมีที่ใช้เตรียม Acetone powder

- Acetone (BDH Laboratory Supplies Poole, BH 15 1TD, England)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

- Bradford Reagent (SIGMA, B-6916, Germany)
- Albumin from bovin serum (FLUKA, Biochemika, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

- Di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$, APS AJAX Finechem, Australia)
- Sodium hydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$, APS AJAX Finechem, Australia)
- Pyrogallol (ACS Reagent, SIGMA, P-2923, America)
- Citric acid (AR Grade, UNIVER, APS AJAX Finechem, Australia)
- Tri-Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ AR Grade, UNIVER, APS AJAX Finechem, Australia)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรด

- Sodium hydroxide (NaOH AR Grade, Merck, Germany)
- Phenophthalein

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาจำนวนครั้งของการกดเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำที่ส่วนเกินออกจากผิวนอกของชิ้นผักเพื่อทำให้ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคสะเด็ดน้ำ และวิธีการวัดสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาจำนวนครั้งของการกดเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำส่วนเกินเพื่อทำให้ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคสะเด็ดน้ำ

นำผักกาดหอมห่อมาแกะใบชั้นนอก 2-3 ใบ ออกทิ้ง หั่นชิ้นตามความยาวของก้านใบขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร และแยกเอาส่วนที่เป็นใจกลางผักออกทิ้ง เนื่องจากเป็นส่วนของเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ มีอัตราการหายใจสูงกว่าปรกติ

วิธีการทดลอง ชั่งน้ำหนักผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม แช่น้ำ และนำมาทำให้สะเด็ดน้ำโดยใช้เครื่องเหวี่ยงแยกน้ำ (ภาพที่ 3.3)

การบันทึกผลการทดลอง ชั่งน้ำหนักของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคภายหลังจากการกดเครื่องเหวี่ยงทุกๆ 5 ครั้งของการกดเครื่องให้หมุน โดยกดนานครั้งละ 2 วินาที

ภาพที่ 3.3 ลักษณะของเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำส่วนเกินออกจากผิวผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาวิธีการวัดสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

วิธีการทดลอง ชั่งน้ำหนักผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม บรรจุใส่ในถุงโพลีโพร-ไพลีนปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียส)

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดค่าสีผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคด้วยเครื่อง Chromameter ตามระบบ CIE LAB ให้ค่าเป็น L*, a* และ b*

โดยที่ ค่า L* แสดงค่าความสว่างเมื่อมีค่าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าใกล้ 0

ค่า a* เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีออกแดง เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีออกเขียว

ค่า b* เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีออกเหลือง เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีออกน้ำเงิน

คำนวณหาค่า hue จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992 ; Voss, 1992)

hue = arctangent (b*/a*)

เปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์เป็น 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 นำผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคมาวางลงบนจานเพาะเชื้อให้เต็มจาน วัดการเปลี่ยนแปลงสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 5 ตำแหน่งให้ทั่วจานเพาะเชื้อ (Castaner *et al.*, 1996)

วิธีที่ 2 บดผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ลงบนจานเพาะเชื้อให้เต็มจาน วัดการเปลี่ยนแปลงสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 5 ตำแหน่งให้ทั่วจานเพาะเชื้อ (Bolin and Huxsoll, 1991)

2. การประเมินการเกิดสีน้ำตาลของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคโดยใช้ผู้ทดสอบให้เป็นระดับคะแนน 1-9 (Barry-Ryan and O'Beirne, 1999 ; Bolin *et al* ., 1977)

ระดับคะแนน 9 หมายถึง ไม่เกิดสีน้ำตาล

ระดับคะแนน 7 หมายถึง เกิดสีน้ำตาลเล็กน้อย

ระดับคะแนน 5 หมายถึง เกิดสีน้ำตาลปานกลาง

ระดับคะแนน 3 หมายถึง เกิดสีน้ำตาลมาก

ระดับคะแนน 1 หมายถึง เกิดสีน้ำตาลมากที่สุด

3. บันทึกผลที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ของการเก็บรักษา

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดของสารละลายที่ใช้แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

การทดลองที่ 2.1 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลาย 3 ชนิด ที่ใช้แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม

วิธีการทดลอง จัดเตรียมแต่ละกรรมวิธีด้วยการแช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคลงในสารละลาย ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 (ชุดควบคุม)ไม่แช่สารละลาย

กรรมวิธีที่ 2 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 ± 0.1 ด้วยสารละลายกรดซิตริกความ เข้มข้น 1 นอร์มัล) นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 ± 0.1 ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล) นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 ± 0.1 ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล) แต่ละความเข้มข้นนาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 7 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 8 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 9 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 10 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีน น้ำหนัก 50 กรัมต่อถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียส)

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดค่าพีเอชของสารละลายที่ใช้แช่ผักกาดหอมห่อ และผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค ก่อนและหลังการแช่สารละลายด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

2. คุณภาพด้านกายภาพของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

2.1 การเกิดสีน้ำตาลโดยใช้ผู้ทดสอบให้เป็นระดับคะแนน 1-9 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2

2.2 วัดค่าสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคด้วย Chromameter ตามระบบ CIE LAB ให้ค่าเป็น L*, a*และ b* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 ตามวิธีของ Castaner *et al.*(1996)

2.3 บันทึกผลที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ของการเก็บรักษา

3. ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial count) เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ดัดแปลงจากวิธีของ Kiss (1984) ดังนี้

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับเจือจางและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน ใช้เป็นสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่างอาหารประกอบด้วยเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเกลือแกงความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายอยู่ด้วย นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard method agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard method agar จำนวน 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ± 0.1 และมีส่วนประกอบต่อสารละลาย 1 ลิตร ดังนี้

Pancreatic digest of casein	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

3.2 การเตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อ

ใช้มีดและปากคีบสแตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยการเช็ดมีดและปากคีบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ และลนไฟ สุ่มตัดตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคทันทีหลังจากเปิดภาชนะบรรจุออก ตัดตัวอย่างผักกาดหอมห่อจากส่วนต่างๆ ให้ทั่วทั้งภาชนะบรรจุ และจากทุกถุงมารวมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 50 กรัม ใส่ในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ที่ฆ่าเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 200 มิลลิลิตร ปั่นเป็นเวลา 2 นาที

จะได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่มีความเจือจางเป็น 2×10^{-1} ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างข้างต้นใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่มีความเจือจาง 2×10^{-2} เจือจางตัวอย่างผักกาดหอมห่อต่อไปตามวิธีดังกล่าวข้างต้น จนได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อพร้อมบริโภคที่มีความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ 2×10^{-3} ถึง 2×10^{-6})

3.3 การตรวจนับจุลินทรีย์

ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่มีความเจือจางระดับต่างๆใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านฆ่าเชื้อแล้ว ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard method agar ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่ออยู่ ผสมสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อลง สำหรับชุดควบคุมทำโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อ นำจานอาหารที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 3 ชั่วโมง สำหรับการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ CFU/g (King *et al.*, 1991)

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม

กรรมวิธีที่ 1 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.9 ± 0.1 ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล) นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที

กรรมวิธีที่ 4 (ชุดควบคุม) ไม่แช่ในสารละลาย

ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใสในถุงโพลีโพรไพลีน น้ำหนัก 50 กรัมต่อถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียส)

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดค่าพีเอชผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

2. การเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัดโดยใช้ผู้ทดสอบให้เป็นระดับคะแนน 1-9 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2

3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ Hand refractometer รุ่น N 1 ของบริษัท ATAGO (0-32 องศาบริกซ์) โดยใช้น้ำคั้นของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่ปั่นรวมกันมาหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่องมือ

4. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity, TA) ในรูปของกรดซิตริก (Bolin and Huxsoll, 1991) โดยนำน้ำคั้นจากผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลายฟีนอฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ นำไปไตเตรทกับสารละลายด่างมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติ คือเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู วัดปริมาตรสารละลายด่างมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (N) x ปริมาตร NaOH (ml) x meq. citric acid x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้น}}$$

meq. citric acid (milliequivalent of citric acid) = 0.07

5. บันทึกผลทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนถึงสิ้นสุดอายุผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและภาชนะบรรจุที่ใช้ต่ออายุการเก็บรักษาผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

วางแผนการทดลอง แบบแฟคเตอเรียลในสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) มี 3 X 2 กรรมวิธี (อุณหภูมิ X วัสดุที่ใช้บรรจุ) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อ 50 กรัม

วิธีการทดลอง เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 นำผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคแช่ในสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนแบบมีแถบกาวฝาปิดที่ความหนา 40 และ 50 ไมครอน น้ำหนัก 50 กรัมต่อถุง ปิดผนึกแถบกาว (ภาพที่ 3.4) เตรียมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 400 ถุง นำผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่เตรียมได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ผลการทดลองทุกวัน

(ก.) (ข.)

ภาพที่ 3.4 ตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่บรรจุถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 40 ไมครอน (ก.) และ 50 ไมครอน (ข.) น้ำหนัก 50 กรัมต่อถุง

การบันทึกผลการทดลอง

1. คุณภาพทางกายภาพของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

1.1 การเกิดสีน้ำตาลโดยใช้ผู้ทดสอบให้เป็นระดับคะแนน 1-9 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

1.2 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก คำนวณได้จาก สูตร

$$A = \frac{(B - C)}{B} \times 100$$

โดยที่ A คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

B คือ น้ำหนักเมื่อเริ่มต้นเก็บรักษา (ชั่งภายหลังการบรรจุถุงแล้ว)

C คือ น้ำหนักที่ชั่งภายหลังการเก็บรักษา

1.3 วัดค่าสีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคด้วย Chromameter ตามระบบ CIE LAB ให้ค่าเป็น L*, a*และ b* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 ตามวิธีของ Castaner *et al.*(1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2. คุณภาพทางเคมีของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

2.1 ปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid) ในผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค โดยวิธีการไตเตรชันด้วยสารละลายอินโดฟีนอล (Indophenol)

การเตรียมสารละลาย

- สารละลายอินโดฟีนอลความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง 2,6 - dichlorophenol Indophenol 0.2 กรัมละลายในน้ำกลั่นให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง ใส่ในขวดสีชา นำไปเก็บรักษาในตู้เย็น และไม่ควรเก็บสารละลายอินโดฟีนอลเกิน 2 สัปดาห์
- สารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งกรดออกซาลิก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายวิตามินซีมาตรฐาน (Ascorbic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งวิตามินซี 0.05 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำสารละลายวิตามินซีจำนวน 1 มิลลิลิตร มาไตเตรทกับสารละลายอินโดฟีนอล

การเตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อ

สุ่มตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่ปั่นละเอียดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ชั่งน้ำปั่น 10 กรัม แล้วเติมสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แบ่งสารละลายที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ไตเตรทกับสารละลายอินโดฟีนอลจนถึงจุดยุติ คือเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูนานเกิน 10 วินาที

การคำนวณ

- ปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอล a มิลลิลิตร ที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน ซึ่งมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 1 มิลลิกรัม
- ปริมาตรของสารละลายอินโดฟีนอล b มิลลิลิตร ที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ (1 x b)/a มิลลิกรัม เท่ากับ c มิลลิกรัม
- สารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร มีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ c มิลลิกรัม
- สารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ (c x 100)/10 มิลลิกรัม เท่ากับ d มิลลิกรัม
- เนื้อตัวอย่าง 10 กรัม มีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ d มิลลิกรัม
- เนื้อตัวอย่าง 100 กรัม มีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ (d x 100)/10 มิลลิกรัม เท่ากับ E มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักสด

2.2. วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ Hand refractometer รุ่น N1 ของบริษัท ATAGO (0-32 องศาบริกซ์) โดยใช้น้ำคั้นของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่ปั่นรวมกันมาหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่องมือ

2.3. วิเคราะห์ปริมาณของคลอโรฟีลล์ ใช้วิธีของ Whitham *et al.* (1971) โดยใช้ผักกาดหอมห่อน้ำหนัก 1 กรัม บดในโกร่งบด ขณะทำการบดให้เติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปเล็กน้อย เมื่อบดละเอียดให้กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยเครื่องกรองแบบ suction pump ล้างและปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่กรองแล้วใส่ในหลอด cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตนิค-20 บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณ ตามสูตร

$$\text{คลอโรฟีลล์ เอ} = (12.7\,(OD_{663}) - 2.69\,(OD_{645})) \times \frac{V}{1000W}$$

$$\text{คลอโรฟีลล์ บี} = (22.9(\,OD_{645}) - 4.68\,(OD_{663})) \times \frac{V}{1000W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟีลล์

W คือ น้ำหนักของผักกาดหอมห่อที่นำมาสกัดหาคลอโรฟีลล์

OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องสเปคโตนิค-20 ที่ความยาวคลื่นที่กำหนด

3. ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial count) เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง ดัดแปลงจากวิธีของ Kiss (1984) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

4. อายุการเก็บรักษา ประเมินจากระดับคะแนนที่ผู้ทดสอบให้ต่อลักษณะปรากฏของการเกิดสีน้ำตาล ถ้ามีค่าเท่ากับ 5 หรือต่ำกว่าถือว่าผู้ทดสอบไม่ยอมรับ และสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

5. รวบรวมข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยมาประมวลผลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 6.0 เพื่อให้ทราบความแตกต่างของผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้

การทดลองที่ 4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดสีน้ำตาลในผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อ 50 กรัม

วิธีการทดลอง เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 นำผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคแช่ในสารละลายกรดซิตริก 1.0 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 วินาที ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน น้ำหนัก 50 กรัมต่อถุง ปิดผนึกแถบกาว เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เตรียมโดยไม่แช่ในสารละลายบรรจุในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน ปิดผนึกแถบกาว นำตัวอย่างที่เตรียมได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง

1. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้ (Selvaraj and Kumer, 1989)

1.1 เตรียมตัวอย่างในรูป Acetone powder สุ่มตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม แช่ในอะซิโตนที่แช่เย็นอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยเครื่องกรองแบบ suction pump ส่วนที่เหลืออยู่บนกระดาษกรอง เก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

1.2 เตรียมตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคในรูปสด สุ่มตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 10 กรัม แช่ในไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นเนื้อเดียวกันในโกร่งบด นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

1.3 สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าพีเอช 6.8 เตรียมโดยชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 2.492 กรัม และ $NaH_2PO_4.2H_2O$ 5.616 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมีเตอร์ ถ้าสารละลายมีค่าพีเอชสูง หรือต่ำกว่าที่ต้องการเล็กน้อย ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับที่ต้องการโดยใช้สารละลายเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

- สารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าพีเอช 6.8 เตรียมโดยชั่ง $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ 14.117 กรัม และ กรดซิตริก 0.420 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมีเตอร์

ถ้าสารละลายมีค่าพีเอชสูง หรือต่ำกว่าที่ต้องการเล็กน้อยปรับค่าพีเอชให้เท่ากับที่ต้องการ โดยใช้สารละลายเกลือความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

- สารละลายไพโรแกลลอล (pyrogallol) ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยชั่งไพโรแกลลอลมา 1.25 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

1.4 เตรียมเอนไซม์ (crude enzyme) ชั่ง Acetone powder มา 500 มิลลิกรัม ที่เตรียมได้ในข้อ 1.1 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าพีเอช 6.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการบีบผ่านผ้ากรอง 4 ชั้น และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงปรับอุณหภูมิต่ำ ที่ความเร็วรอบ 14,000 x g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนที่ใส (crude enzyme) มาใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

1.5 เตรียมเอนไซม์ (crude enzyme) ใช้ตัวอย่างผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคสดในข้อ 1.2 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.4

1.6 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Selvaraj and Kumar (1989) โดยผสมซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ มีค่าพีเอช 6.8 ปริมาตร 3.4 มิลลิลิตร สารละลายไพโรแกลลอล ความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ 0.05 $Absorbance_{450}$ ที่เปลี่ยนไป/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

1.7 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976)

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard Curve)

เตรียมสารละลายโปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/mL) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามตารางข้างล่างดังต่อไปนี้

หลอดที่	สารละลาย BSA เริ่มต้น (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1 (Blank)	0	5	0
2	0.5	4.5	5
3	1	4	10
4	2	3	20
5	3	2	30
6	4	1	40
7	5	0	50

ปิเปตสารละลายตามตารางข้างต้น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 19 หลอด ความเข้มข้นละ 3 หลอด ยกเว้นหลอดที่ 1 (Blank) ทำเพียงหลอดเดียว เติม Bradford reagent ลงไป 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที พักไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานให้แกน x เป็นระดับความเข้มข้นของ BSA (μg/mL) และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด แต่ละหลอดเติมสารสกัด crude enzyme 1 มิลลิลิตร และเติม Bradford reagent ลงไป 2 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที พักไว้ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

2. วัดค่าพีเอชผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์
3. การเกิดสีน้ำตาลโดยใช้ผู้ทดสอบให้เป็นระดับคะแนน 1-9 เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2
4. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.2
5. ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total microbial count) เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาของชุดควบคุมดัดแปลงตามวิธีของ Kiss (1984) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1
6. บันทึกผลการทดลองทุก ๆ 2 วัน

การทดลองที่ 5 การศึกษาอัตราการหายใจของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคและผักกาดหอมห่อทั้งหัว

การทดลองที่ 5.1 การศึกษาอัตราการหายใจของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่แช่ในกรดซิตริกและผักกาดหอมห่อทั้งหัว

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อ 1 หัว

วิธีการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อทั้งหัว ล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดแต่งส่วนที่ไม่ต้องการ เลือกขนาดหัวที่เท่าๆ กันบรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน ถุงละ 1 หัว จำนวน 25 ถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่แช่ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ 5 วินาที ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเท่ากับน้ำหนักหัวของผักกาดหอมห่อในกรรมวิธีที่ 1 บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน จำนวน 25 ถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 5.2 การศึกษาอัตราการหายใจของผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่แช่ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และไม่แช่สารละลายกรดซิตริก

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค 50 กรัม

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภคที่แช่ด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ 5 วินาที ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน น้ำหนัก 50 กรัม จำนวน 25 ถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหอมห่อตัดแต่งพร้อมบริโภค ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกน้ำโดยกดด้วยมือ 15 ครั้ง บรรจุใส่ในถุงโพลีโพรไพลีนที่ความหนา 50 ไมครอน น้ำหนัก 50 กรัม จำนวน 25 ถุง ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ทุกวัน นาน 7 วัน โดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร เสียบเข้าถุงตัวอย่างที่สุ่มออกมาแต่ละวัน (กรรมวิธีละ 3 ถุง ต่อ วัน) ดูดอากาศออกมา 5 มิลลิลิตร และนำมาฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography ที่ Injector port ซึ่งมีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผ่านเข้า Packed column มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงนอก 1/8 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลางวงใน 0.21 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร ซึ่งบรรจุสาร Porapak R อุณหภูมิของ Oven 60 องศาเซลเซียส โดยมี

ก๊าซฮีเลียมเป็น Carrier gas อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ Thermal conductivity detector ที่มีอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ซึ่งอ่านค่าออกมาเป็นปริมาณของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

2. การคำนวณอัตราการหายใจ (Respiration rate) ของผักกาดหอมห่อจากสมการดังนี้

$$\text{Respiration rate} = \frac{\text{difference in } CO_2 \text{ (\%)} \times \text{free volume (mls)} \times 321.75}{\text{sample wt (kg)} \times \text{Time sealed (mins)} \times (273 + \text{store temp °C})}$$

โดยที่

difference in CO_2 (%) = เปอร์เซ็นต์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (เริ่มต้น - สุดท้าย)

free volume (mls) = ปริมาตรของถุง - ปริมาตรของตัวอย่าง

sample wt (kg) = น้ำหนักตัวอย่าง (กิโลกรัม)

store temp °C = อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (องศาเซลเซียส)

มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมคาร์บอนไดออกไซด์ต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง

3. คำนวณ Respiratory quotient (R.Q.)

$$\text{R.Q.} = \frac{\text{Volume of } CO_2 \text{ produced}}{\text{Volume of } O_2 \text{ taken up}}$$

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University