บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. วัสดุพันธุ์พืช

ผักกาดหอมห่อพันธุ์ เฟลม เก็บเกี่ยวในระยะบริบูรณ์ ระหว่างเดือนมิถุนายน 2544 ถึงเดือนมีนาคม 2545 ซึ่งปลูกที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทุ่งหลวง อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ บรรจุใส่ลังพลาสติกบุรองด้วยกระดาษบรู๊ฟสีขาว แล้วขนส่งมาโดยรถบรรทุกธรรมดาของมูลนิธิโครงการหลวงมาที่งานคัดบรรจุเชียงใหม่ มูลนิธิโครงการหลวง ภายในบริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ระยะเวลาตั้งแต่เก็บเกี่ยวจนกระทั่งเริ่มทำการทดลองประมาณ 8-10 ชั่วโมง คัดเลือกผักกาดหอมห่อเฉพาะที่มีคุณภาพดี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวประมาณ 16-18 เซนติเมตร และน้ำหนักประมาณ 230-250 กรัม แล้วนำมาทำการทดลองทันที

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

2.1 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่งรุ่น BA3100P ของบริษัท Sartorius และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่งรุ่น AB54 ของบริษัท Mettler Toledo

2.2 เครื่องวัดสี Chroma meter รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta หัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, a* และ b*

2.3 เครื่องวัด Head Space Oxygen/Carbon Dioxide Analyzer รุ่น 6600 ของบริษัท Illinois

2.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) รุ่น U2001 ของบริษัท Hitachi

2.5 เครื่องวัดการนำไฟฟ้า (Conductivity meter) รุ่น HI8819N ของบริษัท Hanna

2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Universal 30 KF ของบริษัท Hitachi

2.7 เครื่องปั่นผักและผลไม้ รุ่น S(648) ของบริษัท Moulinex

2.8 เครื่องนับจำนวน (Hand held tally counter) รุ่น 24100 ของบริษัท Diamond

2.9 เครื่องปั่น Spinner สำหรับทำให้ผักใบสะเด็ดน้ำ รุ่น C-2222 ของบริษัท สรรพสินค้าเซ็นทรัล จำกัด

2.10 เครื่องปิดผนึกถุงพลาสติกด้วยไฟฟ้า รุ่น SK-300 ของบริษัท SBtech

2.11 ตู้เย็น รุ่น LC203LD ของบริษัท Freser

2.12 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น AS1324 ของบริษัท Email Westinghouse Pty Ltd.

2.13 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น MIR-553 ของบริษัท Sanyo

2.14 ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น EMO-900T ของบริษัท Sanyo

2.15 หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HL-300 ของบริษัท Hunley

2.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WR10 ของบริษัท Memmert

2.17ไมโครปีเปต (Micropipet) ขนาด 5 มิลลิลิตร รุ่น Pipetman ของบริษัท Gilson และขนาด 10 มิลลิลิตร รุ่น 4720 ของบริษัท Eppendorf

2.18 นาฬิกาจับเวลา รุ่น Sport timer ของบริษัท Casio

2.19 มีด

2.20 เขียง

2.21 สำลี

2.22 เข็มฉีดยา

2.23 โกร่งบด

2.24 เทอร์โมมิเตอร์

2.25 ขวดน้ำกลั่น

2.26 กระติกน้ำแข็ง

2.27 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

2.28 กระบอกอะลูมิเนียม สำหรับใส่จานเพาะเชื้อและปีเปต (ปลอดเชื้อ)

2.29 กระดาษกรอง Whatman No.1

2.30 ถังก๊าซไนโตรเจน (N_2)

2.31 ถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีน ตรามงกุฎ ขนาดกว้าง×ยาว เท่ากับ 20×30 เซนติเมตร

2.32 ถังน้ำพลาสติก ขนาด 2.5 ลิตร

2.33 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์	- หลอดทดลองฝาเกลียวทนความร้อน
- กรวยกรอง	- ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร (ปลอดเชื้อ)
- กระบอกตวง	- จานเพาะเชื้อ (ปลอดเชื้อ)
- ขวดรูปชมพู่	- ช้อนตักสารเคมี
- หลอดทดลอง	- เทปกาวใส

2.33 สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟีลล์

- สารละลายอะซิโตน (acetone) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซิโตนมา 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

สารเคมีที่ใช้วัดการรั่วไหลของอิเล็กโตรไลต์

- สารละลายแมนนิทอล (mannitol, UNIVAR) ความเข้มข้น 5.07 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งแมนนิทอลมา 50.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์มา 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ครบ 950 มิลลิลิตร

- สารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent, Fluka ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงสาร Folin-Ciocaltea Reagent มา 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Merck) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนตมา 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

- สารลาย Gallic acid มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งสาร Gallic acid มา 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

สารเคมีที่ใช้หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารละลายเจือจางตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารเปปโตน (peptone, Becton and Dickinson Company) มา 1 กรัม และมีเกลือแกง (sodium chloride, Becton Dickinson and company) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งเกลือแกงมา 5 กรัม เติมลงในสารละลายเปปโตนผสมให้ละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดแก้วทนความร้อนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ในขวดแก้วทนความร้อน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่เตรียมได้ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ต่อสารละลาย 1 ลิตร ดังนี้

Pancreatic Digest of Casein	5.0 กรัม
Yeast Extract	2.5 กรัม
Dextrose	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Final pH	7.0 ± 0.1

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการสถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การรักษาคุณภาพโดยการใช้ความร้อน

วางแผนการทดลอง แบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิของการจุ่มน้ำร้อน 3 ระดับคือ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาของการจุ่มน้ำร้อน 3 ระยะคือ 1, 1.5 และ 2 นาที

ชุดควบคุม คือ ไม่จุ่มน้ำร้อน

วิธีการทดลอง

นำผักกาดหอมห่อมาตรฐานชั้น 3 มาคัดคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอกัน มีน้ำหนักอยู่ในช่วง 230-250 กรัม ตัดแต่งเอาใบนอกและใบที่ถูกทำลายด้วยโรคและแมลงหรือชอกช้ำออกทิ้ง ประมาณ 4-5 ใบ แล้วหั่นผักกาดหอมห่อให้เป็นชิ้นมีขนาดกว้าง×ยาว ประมาณ 5×8 เซนติเมตร โดยเริ่มหั่นจากบริเวณโคนใบขึ้นไป 3 เซนติเมตร เนื่องจากบริเวณโคนของเส้นกลางใบมีความไวต่อการเกิดอาการจุดสีน้ำตาลแดงมาก (Ke and Saltveit, 1989 ; Loaiza-Velarde *et al.*, 1997) หลังจากนั้นนำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นน้ำหนัก 100 กรัม ใส่ลงในตะกร้าพลาสติกที่มีรูจุ่มลงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส โดยแต่ละระดับอุณหภูมิจุ่มนาน 1, 1.5 และ 2 นาที แล้วนำไปจุ่มในน้ำเย็น (อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส) นาน 30 วินาทีทันที เพื่อรักษาคุณภาพภายนอกของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นภายหลังผ่านการจุ่มในน้ำร้อน ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องปั่น Spinner สำหรับผักใบ ชุดควบคุมคือ ผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นที่ไม่จุ่มในน้ำร้อน นำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นจากทุกวิธีการบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนขนาดกว้าง×ยาว เท่ากับ 20×30 เซนติเมตร ที่เจาะรูด้วยหัวเจาะที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร ด้านละ 9 รู รวมทั้งหมด 18 รู ซึ่งคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 1.51 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ถุงทั้งหมด โดยที่ระยะห่างประมาณ 7 เซนติเมตร แล้วปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกไฟฟ้าถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่ละวิธีการมี 3 ซ้ำๆละ 1 ถุง แต่ละถุงบรรจุผักกาดหอมห่อหั่นชิ้น 100 กรัม นำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นมาทำการประเมินคุณภาพทางกายภาพ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบและการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสตามวิธีการต่างๆ ดังนี้

การบันทึกข้อมูล

ก. การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

1. เปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนัก ซึ่งเป็นน้ำหนักทั้งถุงแสดงผลออกมาดังนี้

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักภายหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

2. การเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบของผักกาดหอมห่อ โดยใช้เครื่องวัดสี Chroma meter (CR-300; Minolta) โดยนำผักกาดหอมห่อทีละชิ้น จำนวน 5 ชิ้นต่อซ้ำ มาวัดสีบริเวณเส้นกลางใบ ซึ่ง calibration ด้วยแผ่นสีขาว (L* = 97.63, a* = -0.53, b* = 2.38) บันทึกค่าในรูป CIE LAB (L* = light/dark, a* = green/red, b* = yellow/blue) คำนวณเป็นค่าหาค่าต่างๆ ตามสมการ

$$\text{Hue angle } (h^*) = \tan^{-1}(b/a)$$

$$\text{Chroma } (C^*) = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$\text{Total color difference } (dE) = [(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2]^{1/2}$$

โดยที่ ค่า L_0 a_0 และ b_0 เป็นค่าที่วัดได้จากวันเริ่มต้นของการเก็บรักษา (Gnanasekharan *et al.*, 1992)

ข. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Kader *et al.* (1973)

1. การเกิดสีน้ำตาลที่แผ่นใบ การเกิดสีน้ำตาลที่ขอบใบ และการเกิดจุดสีน้ำตาลที่เส้นกลางใบ การประเมินทำโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 4 คน และกำหนดคะแนนการเกิดสีน้ำตาลดังนี้

ระดับที่ 1 คือไม่เกิดสีน้ำตาล คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 0-20 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 2 คือเกิดสีน้ำตาลเล็กน้อย; สีเหลืองอ่อน คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 20-40 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 คือเกิดสีน้ำตาลปานกลาง; สีน้ำตาลปนเหลือง คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 คือ เกิดสีน้ำตาลมาก; สีสนิมปนน้ำตาล คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลระหว่าง 60-80 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 5 คือ เกิดสีน้ำตาลมากที่สุด; สีสนิมเข้มปนน้ำตาล คิดเป็นระดับการเกิดสีน้ำตาลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

2. การเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-odor) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 4 คน และกำหนดคะแนนการเกิดกลิ่นผิดปกติ ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ ไม่เกิดกลิ่นผิดปกติ

ระดับที่ 2 คือ เกิดกลิ่นผิดปกติ

3. การสูญเสียความกรอบ (crispness) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 4 คน และกำหนดคะแนนการสูญเสียความกรอบ ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ ไม่สูญเสียความกรอบ

ระดับที่ 2 คือ สูญเสียความกรอบ

4. คุณภาพการยอมรับโดยรวม (overall visual quality) ทำการประเมินโดยใช้ผู้ทดสอบประจำ 4 คน และกำหนดคะแนนของคุณภาพการยอมรับโดยรวม ดังนี้

ระดับที่ 1 คือ คุณภาพเลวที่สุด

ระดับที่ 2 คือ คุณภาพเลวมาก

ระดับที่ 3 คือ คุณภาพเลว

ระดับที่ 4 คือ คุณภาพค่อนข้างเลว

ระดับที่ 5 คือ คุณภาพปานกลาง

ระดับที่ 6 คือ คุณภาพค่อนข้างดี

ระดับที่ 7 คือ คุณภาพดี

ระดับที่ 8 คือ คุณภาพดีมาก

ระดับที่ 9 คือ คุณภาพดีที่สุด

เมื่อผู้ทดสอบให้คะแนนในระดับที่ 6 ใช้ตัดสินว่าคุณภาพของผักกาดหอมห่อสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

การทดลองที่ 2 การรักษาคุณภาพโดยใช้การดัดแปลงสภาพบรรยากาศ

วางแผนการทดลอง แบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของถุงบรรจุหีบห่อ คือ ถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่ไม่เจาะรู ที่เจาะรู และที่อัดก๊าซไนโตรเจน

ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิของการเก็บรักษา คือ 1, 5 และ 10 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

เตรียมผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 หลังจากนั้นนำผักกาดหอมห่อที่หั่นชิ้นได้จำนวน 100 กรัม จุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วจุ่มในน้ำเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีทันที เพื่อลดอุณหภูมิของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้น ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องปั่น Spinner สำหรับผักใบ ต่อมานำผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นมาบรรจุลงในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนขนาดกว้าง×ยาว เท่ากับ 20×30 เซนติเมตร ชนิดที่ไม่เจาะรู ที่เจาะรู (ด้านละ 9 รู รวมทั้งหมด 18 รู ซึ่งเป็นพื้นที่ประมาณ 1.51 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ถุงทั้งหมด โดยที่ระยะห่างประมาณ 7 เซนติเมตร) แล้วปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกไฟฟ้าถุงพลาสติก ส่วนการอัดก๊าซไนโตรเจน ทำโดยปิดผนึกถุงโพลีเอทธิลีนก่อนแล้วบรรจุก๊าซไนโตรเจนผ่านปลายเข็มฉีดยาที่ต่อมาจากถังก๊าซไนโตรเจนจนกระทั่งถุงโพลีเอทธิลีนพองเต็มที่ แล้วปิดรอยเจาะของเข็มฉีดยาด้วยเทปกาวพลาสติกใสให้สนิท นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1, 5 และ 10 องศาเซลเซียส กำหนดให้แต่ละวิธีการมีจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 1 ถุง แต่ละถุงบรรจุผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นน้ำหนัก 100 กรัม จำนวนทั้งสิ้น 192 ถุง แล้วสุ่มผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นมาประเมินคุณภาพทางกายภาพทุกวัน คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบ

และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ตามวิธีการเช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 ทำการเก็บรักษานาน 7 วัน

การทดลองที่ 3 การตรวจสอบคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ มี 3 วิธีการคือ

วิธีการที่ 1 ผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่ไม่เจาะรู

วิธีการที่ 2 ผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่เจาะรู

วิธีการที่ 3 ผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่อัดก๊าซไนโตรเจน

วิธีการทดลอง

เตรียมผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นำผักกาดหอมห่อที่หั่นชิ้น 100 กรัม จุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วจุ่มในน้ำเย็น (อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส) เพื่อลดอุณหภูมิของผักกาดหอมห่อหั่นชิ้น ทำให้สะเด็ดน้ำด้วยเครื่องปั่น Spinner สำหรับผักใบ นำผักกาดหอมห่อทุกวิธีการบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนขนาดกว้าง×ยาว เท่ากับ 20×30 ซม. ชนิดไม่เจาะรู เจาะรู (ด้านละ 9 รู รวม 18 รู ซึ่งเป็นพื้นที่ 1.51 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ถุงทั้งหมด โดยที่ระยะห่างประมาณ 7 เซนติเมตร) และชนิดที่อัดก๊าซไนโตรเจนแล้วปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกไฟฟ้าถุงพลาสติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส กำหนดให้ แต่ละวิธีการมีจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 1 ถุง แต่ละถุงบรรจุผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นหนัก 100 กรัม เตรียมทั้งหมด 30 ถุง แล้วสุ่มผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นมาประเมินคุณภาพทางกายภาพ คือ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบ การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ตามวิธีเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 บันทึกปริมาณก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในถุงบรรจุ วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำการเก็บรักษานาน 7 วัน

การบันทึกข้อมูล

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟีลล์ ตามวิธีการของ Witham *et al.* (1971)

นำส่วนของใบผักกาดหอมห่อที่เป็นสีเขียว น้ำหนักประมาณ 1 กรัม บดในโกร่งบด ขณะบดเติมสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปเล็กน้อย เพื่อให้การบดง่ายและสะดวกมากขึ้น เมื่อบดละเอียดแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิโตนให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 20 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectophotometer โดยใช้สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟีลล์ ในรูปของปริมาณคลอโรฟีลล์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

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

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

$$\text{ปริมาณคลอโรฟีลล์ทั้งหมด} = [\, 20.2\,(OD_{645}) + 8.02\,(OD_{663})\,] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟีลล์

W คือ น้ำหนักของผักกาดหอมห่อที่นำมาสกัดคลอโรฟีลล์

OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่อง Spectophotometer ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

2. การวิเคราะห์หาการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์มาจากวิธีการของ Varoquaux *et al.* (1996)

นำตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นมา 30 กรัม แช่ในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้น 5.07 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 300 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลายท่วมเหนือตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้น นำไปตั้งไว้นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดการนำไฟฟ้าด้วยเครื่องวัดการนำไฟฟ้า (conductivity) แสดงค่าการนำไฟฟ้าในรูปของการนำไฟฟ้าไมโครซีเมนต์ ต่อ 30 กรัมน้ำหนักสด

3. วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล ตามวิธีการของ Hyodo *et al.* (1978) Ketsa and Atantee (1998) และ Singleton and Rossi (1965) โดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลต้องกระทำในสภาพอุณหภูมิต่ำ เพื่อควบคุมระดับกิจกรรมของปฏิกิริยาเคมี ตามขั้นตอนในแผนภูมิที่ 1

ชั่งผักกาดหอมห่อมา 3 กรัม

↓

เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์จำนวน 12 มิลลิลิตร
บดให้ละเอียดที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส)

↓

นำของเหลวที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
ความเร็ว 1,100 รอบ/นาที
นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
ดูดส่วนใสด้วยไมโครปิเปตมา 2 มิลลิลิตร

↓

เติมสารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent (Fluke) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 8 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน
ตั้งไว้นาน 8 นาที

↓

เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์
จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
ตั้งไว้นาน 2 ชั่วโมง

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

↓

นำค่า OD ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับเส้นกราฟสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

แผนภูมิที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล
(ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด)

4. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (total microbial count) ตามวิธีการของ Kiss (1984)

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นหนักประมาณ 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนจำนวน 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างผักกาดกาดหอมห่อที่มีความเจือจางเป็น 2×10^{-1} ใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างข้างต้น ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนอยู่แล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่มีความเจือจาง 2×10^{-2} ทำการเจือจางตัวอย่างผักกาดหอมห่อต่อไปเรื่อยๆ ตามวิธีการข้างต้น จนได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อหั่นชิ้นที่มีความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ 2×10^{-3} ถึง 2×10^{-6})

การใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อที่มีความเจือจางระดับต่างๆใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยสารละลายตัวอย่างแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar ที่หลอมเหลวประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่ออยู่ ผสมสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วปิดผนึกรอบด้วยพาราฟิล์ม สำหรับชุดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างผักกาดหอมห่อ นำจานอาหารที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส นาน 48 $\pm$ 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวนหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$จำนวนโคโลนี ต่อกรัมน้ำหนักสด (log CFU/g)