# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

หม้อนึ่งความดันไอ

Haemacytometer ของ Clay-Adams

Micropipette

High Refrigerated speed centrifuge

กระดาษกรอง Whatman No.1

กระดาษกรองแบคทีเรีย (membrane filter) ชนิด cellulose acetate filter

เครื่องกรองแบคทีเรีย Sartorius model D-3400

เครื่องเขย่า rotary shaker ของ Kika Labortechnik รุ่น KS501 digital

เครื่องวัดสี Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta

เครื่องไตเตรท Brinkman digital burette

เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ digital hand refractometer ของ ATAGO รุ่น PR 101

เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (digital balance) ของ Mettler Toledo รุ่น PB 3002-S

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N

สารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 N

สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) 0.01 N

สารละลายกรดออกซาลิก (oxalic acid) 0.4%

สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)

2,6-dichlorophenolindophenol

อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (NB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ meat extract agar (MEA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**วัสดุพันธุ์พืชที่นำมาใช้ในการทดลอง**

ผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้งที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 100 กรัม มาจากแหล่งปลูกใน อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

**การทดลองที่ 1 การรวบรวมจุลินทรีย์จากอาหารและเชื้อสาเหตุโรคราเขียว**

**1.1 การรวบรวมจุลินทรีย์จากอาหาร**

รวบรวมจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทำอาหารต่างๆ เช่น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทำไวน์ แหนม ถั่วเน่า น้ำส้มสายชู เป็นต้น โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**1.2 เชื้อสาเหตุที่ใช้ในการทดลอง**

*Penicillium digitatum* ที่แยกได้จากผลส้มเขียวหวานพันธุ์สายน้ำผึ้ง ที่มีอาการโรคราเขียว โดยใช้เข็มเขี่ยตัดชิ้นส่วนบนผลส้มบริเวณที่เกิดอาการของโรคมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

**การทดลองที่ 2 การทดสอบการเกิดโรคและประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**2.1 การทดสอบการเกิดโรค**

เตรียมผลส้มโดยใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมบนผิวส้มบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อสาเหตุ ผลละ 1 วง ทำการทดลองโดยมี 2 กรรมวิธี คือการทำแผลก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุและไม่ทำแผลก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ ในกรรมวิธีที่ทำแผลนั้นจะทำแผลบนผิวส้มโดยใช้ inoculator (ภาคผนวก ก) จิ้มลงในวงกลมที่เขียนไว้บนผิวส้มวงละ 1 ครั้ง จากนั้นหยด spore suspension ของเชื้อราสาเหตุ *P. digitatum* ซึ่งเตรียมได้โดยนำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เทลงในผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มี *P. digitatum* เจริญอยู่ ใช้ห่วงถ่ายเชื้อขูดบริเวณผิวหน้าอาหารที่มีสปอร์ของเชื้อ *P. digitatum* เจริญอยู่ จากนั้นนำ spore suspension ที่ได้มานับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ haemacytometer ให้ได้ปริมาณ $10^5$ สปอร์/มิลลิลิตร หยดลงบนแผลที่ทำไว้ แผลละ 20 ไมโครลิตร วางกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบนแผล นำไปวางในภาชนะควบคุมความชื้น (ภาคผนวก ก) และนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ส่วนในกรรมวิธีที่ไม่ทำแผลนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับในกรรมวิธีทำแผล แต่ไม่ต้องใช้ inoculator จิ้มลงบนผิวส้ม สังเกตอาการเกิดโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ทำแผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**2.2 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ร่วมกับเชื้อสาเหตุในจานเลี้ยงเชื้อ (dual culture technique)**

เตรียม *P. digitatum* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA จนมีอายุประมาณ 10 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา นำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ในจานเลี้ยงเชื้อทดสอบ โดยวางห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาวางที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส จนมีอายุประมาณ 10 วัน จากนั้นใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ NA มาลากเป็นเส้นตรงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ด้านตรงข้ามกับเชื้อ *P. digitatum* โดยให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้ออีกด้าน 2 เซนติเมตรเช่นเดียวกัน ส่วนในชุดควบคุมวางเฉพาะโคโลนีของเชื้อ *P. digitatum* สังเกตขนาดของโคโลนีเชื้อ *P. digitatum* ด้านที่เจริญเข้าหาจุลินทรีย์จากอาหารเปรียบเทียบกับในชุดควบคุม

**2.3 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุในจานอาหาร**

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ได้คัดเลือกจากการทดลอง 2.2 โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ haemacytometer นับให้ได้ $10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอน นำสารละลายใสที่ได้จากการปั่น (supernatant) ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วกรองซ้ำด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย (Sartorius model D-3400) โดยใช้เยื่อกรอง (membrane filter) ชนิด cellulose acetate filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูของเยื่อกรอง 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ (culture filtrate) มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ให้ได้ความเข้มข้น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ทำการตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีอายุ 10 วัน ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมย้ายชิ้นวุ้นมาวางตรงกลางบนผิวหน้าอาหาร MEA ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ จานละ 1 ชิ้น ส่วนในชุดควบคุมวางเฉพาะโคโลนีของเชื้อรา *P. digitatum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *P. digitatum* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อทุกๆ 3 วัน จนเชื้อรา *P. digitatum* ในชุดควบคุมเจริญเกือบเต็มจานเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับเชื้อรา *P. digitatum* ในชุดควบคุม นำค่าของเส้นผ่าศูนย์กลางที่วัดได้มาคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้ง (%) โดยสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง (\%)} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

A = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *P. digitatum* ในชุดควบคุม

B = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *P. digitatum* ที่เลี้ยงร่วมกับน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

**การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเกิดโรคบนผลส้ม**

เตรียมผลส้มโดยกรรมวิธีการทำแผลก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุและทำการปลูกเชื้อสาเหตุด้วยวิธีเดียวกับในข้อ 2.1 นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำผลส้มมาจุ่มใน cell suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 11 ชนิดที่ปริมาณ $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที ส่วนในชุดควบคุมทำการทดลองโดยปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลที่เกิดขึ้นทุกวันจนเชื้อรา *P. digitatum* ในชุดควบคุมเจริญเต็มผล เปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลในชุดควบคุม

**การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนผลส้ม**

**4.1 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยสารละลายแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cell suspension)**

เตรียมผลส้ม โดยใช้ปากกาเคมีกันน้ำวาดวงกลมลงบนผิวส้มบริเวณที่จะทำการปลูกเชื้อรา *P. digitatum* ผลละ 1 วง จากนั้นทำแผลบนผลส้ม (W) โดยใช้ inoculator จิ้มลงในวงกลมวงละ 1 ครั้ง นำไปทดสอบกับ cell suspension โดยจุ่มลงใน cell suspension ที่เตรียมไว้ 3 นาที ซึ่งเตรียมได้โดยเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ haemacytometer นับให้ได้ $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร และทดสอบร่วมกับ spore suspension ของ *P. digitatum* (PD) ปริมาณ $10^5$ สปอร์/มิลลิลิตร แผลละ 20 ไมโครลิตร

**4.2 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยสารละลายแขวนลอยในน้ำกลั่น (washed cell suspension)**

เตรียมผลส้มและ spore suspension ของ *P. digitatum* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.1 นำไปทดสอบร่วมกับ washed cell suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเตรียมโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer นับให้ได้ $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอน ล้างเซลล์ที่ตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปั่นซ้ำด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที อีก 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นนับจำนวนเซลล์ให้ได้ $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร

**4.3 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate)**

เตรียมผลส้มและ spore suspension ของ *P. digitatum* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.1 นำไปทดสอบร่วมกับ culture filtrate ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเตรียมได้โดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเหลว NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพู่ เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer นับให้ได้ $10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เชื้อตกตะกอน กรองสารละลายใสที่ได้จากการปั่น (supernatant) ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วกรองซ้ำด้วยเครื่องกรองแบคทีเรีย (Sartorius model D-3400) โดยใช้เยื่อกรอง (membrane filter) ชนิด cellulose acetate filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเยื่อกรอง 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ (culture filtrate) มาทดสอบ

**4.4 การทดสอบประสิทธิภาพจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ (media)**

เตรียมผลส้มและ spore suspension ของ *P. digitatum* เช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.1 นำไปทดสอบร่วมกับอาหารเหลว NB ที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ซึ่งในแต่ละการทดสอบจะมี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ผลส้มทำแผล (W) + จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

กรรมวิธีที่ 2 ผลส้มทำแผล (W) + จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ + *P.digitatum* (PD) ทันที

กรรมวิธีที่ 3 ผลส้มทำแผล (W) – จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ + *P.digitatum* (PD) หลัง 2 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 4 ผลส้มทำแผล (W) + *P.digitatum* (PD) + จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ หลัง 3 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 5 ผลส้มทำแผล (W) + *P.digitatum* (PD) (CONTROL)

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ข้างต้นจะไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลที่เกิดขึ้นทุกวัน จนเชื้อรา *P. digitatum* ในชุดควบคุม (CONTROL) เจริญเต็มผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**การทดลองที่ 5 การศึกษาผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อคุณภาพของผลส้ม**

ในการศึกษาผลของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อคุณภาพของผลส้มนี้จะแบ่งเป็น 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธี 1 นำผลส้มจุ่มในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทดลองได้ผลจากการทดลองที่ 4 คือ จุ่มใน cell suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธี 2 นำผลส้มจุ่มในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทดลองได้ผลจากการทดลองที่ 4 อีกวิธีหนึ่ง คือ จุ่มใน washed cell suspension ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธี 3 ผลส้มที่ไม่ได้จุ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ดังนี้

**5.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ**

**5.1.1 การสูญเสียน้ำหนัก**

ชั่งน้ำหนักผลส้มในวันเริ่มต้นทำการการทดลองและทุกๆ 3 วันตลอดการทดลอง นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักวันที่ตรวจผล}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

**5.1.2 การเปลี่ยนแปลงสีผิว**

วัดสีผิวของผลส้มด้วยเครื่องวัดสี Hunter's colorimeter model CR-200 โดยวัดผลละ 2 ครั้ง บริเวณกึ่งกลางผลทั้ง 2 ด้าน วัดบริเวณนั้นทุกครั้งของการวัดผลและทำการวัดผลทุกๆ 3 วัน ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L* , a* , b*, c* และ $h^{O}$

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

a* , b* = The chromaticity coordinates (hue)

c* = chroma

$h^{O}$ = hue angle

เมื่อ L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากเข้าใกล้ 100 หมายถึง วัตถุมีสีสว่าง

a* มีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง หากเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

b* มีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* มีค่าอยู่ในช่วง –60 ถึง +60 หากมีค่าเป็น 0 หมายถึง วัตถุมีสีเทา

c* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง หากมีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

$h^{O}$ มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

โดยค่า c* และ $h^{O}$ นั้นจะทำการวิเคราะห์จากโปรแกรม Hunter Lab version 4.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**5.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี**

**5.2.1 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solids content, SSC)**

ใช้ Digital hand refractometer หยดน้ำคั้นของผลส้มลงไป อ่านค่าที่ออกมาได้เป็นเปอร์เซ็นต์

**5.2.2 การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity , TA)**

โดยนำน้ำคั้นของผลส้มปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาไตเตรทด้วยสารละลายด่างมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N โดยใช้เครื่อง pH meter วัดจุดยุติ (end point) จะอ่านค่า pH ได้ 8.2 นานประมาณ 30 วินาที บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ตามสูตร

$$\%TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml)} \times 0.064^{*} \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นของผลส้ม}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

**5.2.3 การวัดปริมาณวิตามินซี โดยใช้ Indophenol Method**

5.2.3.1 การทำมาตรฐาน indophenol dye (standardization of indophenol dye)

ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) 2-3 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.04% indophenol dye 15 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1 N HCl 10 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที แล้วจึงไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$) 0.01 N เมื่อถึงจุดยุติ (end point) จะได้สีชมพู ให้ใช้น้ำแป้ง 1-2 มิลลิลิตร หยดลงไปดูว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีชมพูอีก นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$1 \text{ ml dye equivalent} = \frac{\text{ml } Na_2S_2O_3 \times \text{N } Na_2S_2O_3 \times 88 \times 100}{1000 \times \text{ml dye}}$$

ml $Na_2S_2O_3$ = ปริมาณสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทเป็นมิลลิลิตร

N $Na_2S_2O_3$ = ความเข้มข้นของ $Na_2S_2O_3$ ซึ่งเท่ากับ 0.01 N

ml dye = ปริมาตรสารละลาย indophenol dye ความเข้มข้น 0.04 % ซึ่งเท่ากับ 15 มิลลิลิตร

88 = น้ำหนักสมมูลย์ (equivalent weight) ของวิตามินซี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

นำน้ำคั้นของผลส้มมา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดออกซาลิก เข้มข้น 0.4% เป็น 50 มิลลิลิตร มาทำการไตเตรทกับสารละลาย indophenol dye เข้มข้น 0.0.4% จนถึงจุดยุติได้สีชมพูใส นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$\text{mg Ascorbic acid / 100 ml. juice} = \frac{B \times 100 \times \text{dye equi} \times \text{titer}}{A \times \text{volume of sample uesd}}$$

dye equi = 1 ml dye equivalent ที่คำนวณได้จากการทำมาตราฐาน indophenol dye

titer = ปริมาตรสารละลาย indophenol dye ที่ได้จากการไตเตรท

A = ปริมาตรน้ำคั้นของผลส้ม ซึ่งเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

B = ปริมาตรที่ปรับด้วยกรดออกซาลิก ซึ่งเท่ากับ 50 มิลลิลิตร

Volume of sample used = 50 มิลลิลิตร

ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีทั้ง การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (SSC) การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (TA) และการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี จะทำการวัดผลในวันที่เริ่มต้นทำการทดลองและทุกๆ 3 วัน ตลอดการเก็บรักษา เปรียบเทียบกับในชุดควบคุม

**5.3 การประเมินคุณภาพในการบริโภคโดยการชิม**

โดยใช้ผู้ชิมจำนวน 5 คน ตลอดการทดลองเพื่อประเมินคุณภาพในการบริโภคโดยการชิม จะทำการวัดผลในวันที่เริ่มต้นทำการทดลองและทุกๆ 3 วัน ตลอดการเก็บรักษา เช่นเดียวกับในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี โดยจะวัดผลให้เป็นระดับคะแนนดังนี้ (วิกันดา, 2541)

1 = เปรี้ยวมาก

2 = เปรี้ยวปานกลาง

3 = เปรี้ยวเล็กน้อย

4 = จืด

5 = หวานเล็กน้อย

6 = หวานปานกลาง

7 = หวานมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved