บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุเกษตร

ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sai Nam Puang) จากบริษัทเชียงใหม่ ธนาธร จำกัด อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ขนาดเบอร์ 4-5 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.2-6.7 เซนติเมตร น้ำหนักผลประมาณ 104 กรัม เก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้า ในช่วงเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ผ่านการเคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิว CITROSOL-AK จากบริษัทเชียงใหม่ธนาธร จำกัด โดยมีความหนาของสารเคลือบผิวโดยเฉลี่ย 0.034 มิลลิเมตร ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คัดเลือกผลที่ไม่มีตำหนิ แล้วบรรจุผลส้มลงในตะกร้าพลาสติก เก็บรักษาผลส้มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 10±2, 16±2, 22±2 และ 28±2 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำการทดลองในวันถัดไป

3.2 วัสดุอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland)

3.2.2 เครื่อง digital refractometer (ATAGO, PR-101, Japan)

3.2.3 เครื่องไทเทรตอัตโนมัติ (Autotitrator, SCHOTT, TitroLine easy, Belgium)

3.2.4 เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH-meter, SCHOTT GERATE, Consort C 831, Belgium)

3.2.5 เครื่อง Gas Chromatograph (TRACE GC, Thermo Quest Italia SpA., Italy)

3.2.6 เครื่อง Gas Chromatograph (Agilent, 6820N, U.S.A)

3.2.7 เครื่องไทเทรต (digital burette, SLAMED, Burette Digital DB, Germany)

3.2.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, SANYO, MIR-553, Japan)

3.2.9 อ่างควบคุมอุณหภูมิระบบหมุนเวียน (Heat circulator water bath, MV-26, Germany)

3.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ทำนายการเกิดการหมักของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวทางการค้า ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สรีรวิทยา และเคมีของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเกิดการหมักของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ผ่านการเคลือบผิวกับการพยากรณ์ เพื่อ validate model

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทำนายการเกิดการหมักของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิวทางการค้า ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สรีรวิทยา และเคมีของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยมีกรรมวิธีในการทดลองคือ เก็บรักษาผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่อุณหภูมิ 10±2, 16±2, 22±2 และ 28±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±2, 75±2, 78±2 และ 82±2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 3 ผล ทำการตรวจวิเคราะห์ผลทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งเกิดการหมัก ศึกษาอายุการเก็บรักษา (วัน) ของผลส้มที่เก็บรักษาในแต่ละช่วงอุณหภูมิ เพื่อการทำนายการเกิดการหมักและหาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษากับปริมาณเอทานอลที่มีผลต่อคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ ทำการตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มตามวิธีการในหัวข้อ 3.5

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบการเกิดการหมักของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่ผ่านการเคลือบผิวกับการพยากรณ์ เพื่อ validate model

การทดลองเพื่อเปรียบเทียบยืนยันความถูกต้องของการพยากรณ์การเกิดการหมักและการสูญเสียน้ำหนักของผลส้ม ที่ได้มาจากการทดลองที่ 1

โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว โดยตัวแปรหนึ่งเป็นตัวแปรเหตุ หรือตัวแปรอิสระ (independent variable) และอีกตัวแปรหนึ่ง เป็นตัวแปรผล หรือตัวแปรตาม (dependent variable) จากการทดลองที่ 1 พบว่า เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลส้ม และปริมาณเอทา-นอลในน้ำส้มคั้นนั้นมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการเก็บรักษาผลส้ม ซึ่งการศึกษาความสัมพันธ์ สามารถใช้สถิติการถดถอยอย่างง่าย (simple regression) มาหาความสัมพันธ์

ระหว่างตัวแปร โดยสมการการถดถอยอย่างง่ายเชิงเส้น (simple linear regression equation) เขียนได้ดังนี้

$$Y = aX + b$$

จากสมการข้างต้น นำมาศึกษาหาความสัมพันธ์ของ

1. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลและระยะเวลาในการเก็บรักษา

2. ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักและระยะเวลาในการเก็บรักษา

เพื่อนำความสัมพันธ์ที่ได้มาสร้างสมการพยากรณ์ทำนายการเกิดการหมัก และการสูญเสียน้ำหนักของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง โดยใช้ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจำนวน 10 ผล เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ทำการตรวจวิเคราะห์ผลในวันที่ 15 และ 30 ภายหลังการเก็บรักษา หาความแตกต่างของข้อมูลผลการทดลองกับสมการพยากรณ์

3.5 วิธีการวิเคราะห์ผล

3.5.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด

การสูญเสียน้ำหนักคือ น้ำหนักที่หายไปของผลส้มระหว่างการเก็บรักษา โดยการชั่งน้ำหนักผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเมื่อวันเริ่มต้นทดลองโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆ ข้างต้น ทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ 3 วัน โดยใช้ผลส้มชุดเดิมในแต่ละกรรมวิธี นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักผลส้มก่อนการเก็บรักษา-น้ำหนักผลส้มหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักผลส้มก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

3.5.2 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดคือ ปริมาณของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ ของแข็งที่ละลายน้ำได้มักจะเป็นน้ำตาลและกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งกรดแอมิโนและกรดแอสคอร์บิกด้วย (ลักขณาและนิธิยา, 2544) นำน้ำส้มคั้นมาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้โดยใช้เครื่อง digital refractometer โดยหยดน้ำส้มลงบนแผ่นปริซึมของเครื่องมือ ซึ่งอ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.5.3 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity; TA)

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, MERCK, Darmstadt, Germany) 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ โดยการนำน้ำส้มคั้นตัวอย่างที่มีจำนวนแน่นอนมาไทเทรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน จนถึงจุดยุติ (end point) โดยสังเกตจากค่าพีเอช

ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้วิเคราะห์โดยวิธีไทเทรตชัน ชั่งน้ำส้มคั้นจำนวน 5 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจำนวน 45 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำให้เข้ากัน แล้วจึงไทเทรตด้วยเครื่องไทเทรตอัตโนมัติ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.2 บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ แล้วจึงคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำส้มคั้น) โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานดังนี้ (AOAC, 2000)

1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.07 กรัม

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของNaOH(0.1N) x ปริมาตรของNaOH(ml.) x 0.07 x100}}{\text{ปริมาตรน้ำส้มคั้น (ml.)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.07

3.5.4 ค่าพีเอช

การวัดค่าพีเอชเป็นการวัดค่าความเป็นกรดหรือความเป็นด่างของสารละลายใดๆ ซึ่งผันแปรตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่มีอยู่ในสารละลายนั้นๆ (นิธิยา, 2549) เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชจะลดลง

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

นำน้ำส้มคั้นมาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

3.5.5 ปริมาณวิตามินซี

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (ไม่มีสี) จะไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันกับ indophenol dye คือ 2,6-dichlorophenol-indophenol (สีน้ำเงินเข้ม) เกิดเป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถึงจุดยุติที่เกินพอ จะเป็นสีชมพูในสารละลายกรด ซึ่งสารละลายที่มีกรดออก-ซาลิกจะรักษาสภาพให้เป็นกรด และหลีกเลี่ยงการเกิด auto-oxidation ของกรดแอสคอร์บิกที่ค่าพีเอชสูง

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งกรดออกซาลิก (oxalic acid, MERCK, Darmstadt, Germany) จำนวน 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง 2,6-dichlorophenol-indophenol (SIGMA-Aldrich, Chemie, Steinhem, Germany) จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลาย แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 (Whatman, International, England) เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ppm โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, HPLC grade, MERCK, Darmstadt, Germany) จำนวน 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิก ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร (1,000 ppm) แล้วปิเปตต์สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม นำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตรสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหากรดแอสคอร์บิก

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกในน้ำส้มคั้น ด้วยวิธี Indophenol ทำโดยชั่งน้ำส้มคั้นจำนวน 10 กรัม มาเติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.1 นำสารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องไทเทรต จนถึงจุดยุติซึ่งได้สารละลายมีสีชมพูที่คงตัวนานประมาณ 15 วินาที แล้วคำนวณหากรดแอสคอร์บิก โดยใช้ปริมาตร 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้กับสารตัวอย่าง เปรียบเทียบกับปริมาตร 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้กับสารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (Ranganna, 1986)

โดยคำนวณตามสูตร

ปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)

ปริมาตร indophenol dye b มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ(1xb)/aมิลลิกรัม (จากสารละลายตัวอย่าง)

				เท่ากับ	c	มิลลิกรัม
สารละลายน้ำส้ม	10	มิลลิลิตร	มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก	เท่ากับ	c	มิลลิกรัม
สารละลายน้ำส้มเจือจาง	100	มิลลิลิตร	มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก	เท่ากับ	(cx100)/10	มิลลิกรัม
				เท่ากับ	d	มิลลิกรัม
น้ำส้ม	10	กรัม	มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก	เท่ากับ	d	มิลลิกรัม
น้ำส้ม	100	กรัม	มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก	เท่ากับ	(dx100)/10	มิลลิกรัม

เท่ากับ e มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำส้มคั้น

3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในน้ำส้มคั้น

เมื่อของพืชเซลล์ขาดออกซิเจน และ NADH ไม่ถูกออกซิไดซ์ในระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ทำให้ภายในเซลล์ที่ขาดออกซิเจนจะมี NAD^+ อยู่น้อย แต่มี NADH มาก กรดไพรูวิกจึงถูกรีดิวซ์ไปเป็นแอซีทัลดีไฮด์ หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ และ CO_2 โดยมีเอนไซม์ pyruvate decarboxylase และเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) เร่งปฏิกิริยาดังสมการ (คนัย, 2540)

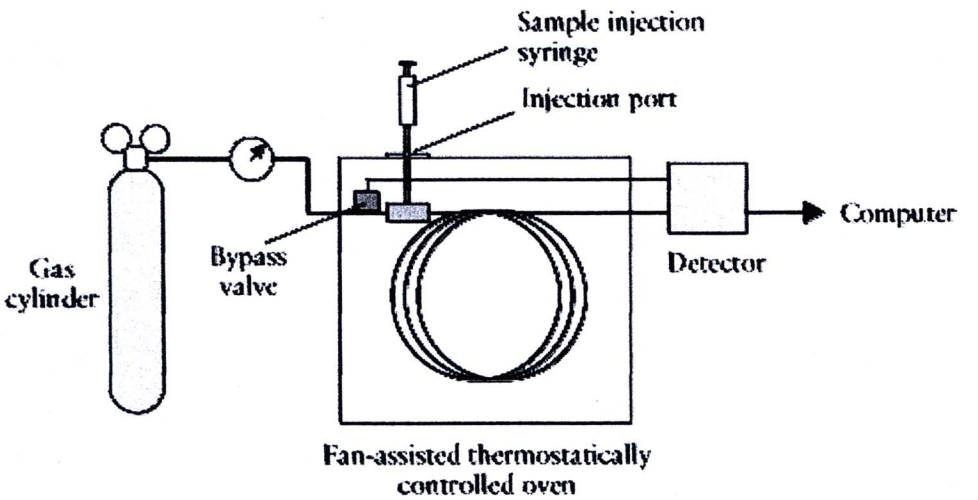
$$\text{แอซีทัลดีไฮด์} + NADH \xleftrightarrow{ADH} \text{เอทานอล} + NAD^+$$

ปริมาณเอทานอลวิเคราะห์ได้โดยการใช้ gas chromatography (GC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ FMC FoodTech (2002) น้ำส้มคั้น 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วสีชาขนาด 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิระบบหมุนเวียน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดเอาแก๊สบริเวณช่องว่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยฉีดแก๊สปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 3 นาที ต่อตัวอย่าง นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเอทานอลในน้ำส้มคั้น โดยเปรียบเทียบกับเอทานอลมาตรฐาน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในผลส้ม

เครื่อง GC เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกสารผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ โดยมีแก๊สตัวพา (carrier gas) เช่น แก๊สฮีเลียม ไนโตรเจน ไฮโดรเจน หรืออากาศ ซึ่งถูกปล่อยจากตัวถังบรรจุแก๊สตัวพา โดยควบคุมความดันด้วยมาตรวัดความดัน (gauge) เพื่อให้มีอัตราการไหลคงที่และถูกต้อง เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าไป แก๊สตัวพาจะพาสารตัวอย่างที่เป็นไอผ่านไปยัง column ที่บรรจุเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และเคลื่อนที่ไปยัง detector ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง recorder หลังจากนั้นเครื่อง recorder จะบันทึกผลออกมาเป็น peak ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณทางดีเทคเตอร์ (detector response) และเวลา เรียกว่า chromatogram (นินนาท์, 2546) ส่วนประกอบของเครื่อง GC มีลักษณะดังแสดงในภาพ 3.1



ภาพ 3.1 ส่วนประกอบของเครื่อง Gas chromatography

ที่มา : http://www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/main.html

ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มขนาด 0.53 x 25 มิลลิลิตร (Nipro, บริษัทนิโปรประเทศไทย จำกัด, ประเทศไทย) ที่ผ่านการฉีดไล่แก๊สออกซิเจนด้วยแก๊สฮีเลียม แล้วใช้ปลายเข็มแทงเข้าไปบริเวณกึ่งกลางของก้นผลส้มระหว่างที่แช่ผลส้มไว้ใต้น้ำ โดยให้ปลายเข็มเข้าไปอยู่บริเวณช่องว่างภายในผลส้ม แล้วดูดเอาแก๊สออกมาวิเคราะห์ปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในผลส้มด้วยเครื่อง GC ทำการฉีดแก๊สปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 8.9 นาที ต่อตัวอย่าง เพื่อนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณปริมาณแก๊สออกซิเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ภายในผลส้ม โดยเปรียบเทียบกับแก๊สมาตรฐาน