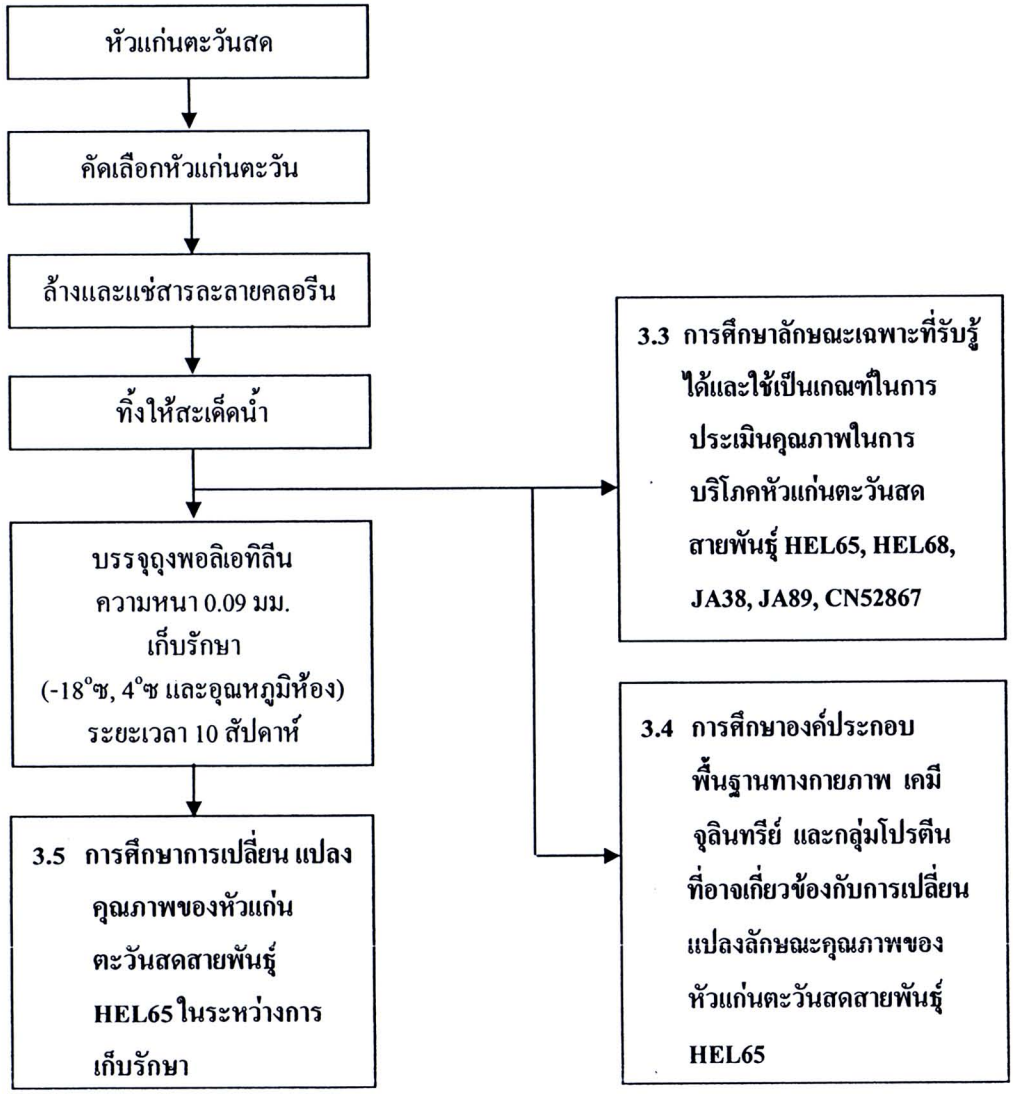
บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิทยานิพนธ์นี้เป็นการศึกษาลักษณะเฉพาะที่รับรู้ได้ของหัวแก่นตะวันสดสายพันธุ์ต่างๆ องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของหัวแก่นตะวันสดสายพันธุ์ HEL65 และการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางกายภาพ เคมี และกิจกรรมของเอนไซม์ของหัวแก่นตะวันสดสายพันธุ์ HEL65 ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งมีกรอบแนวคิดในการดำเนินงานวิทยานิพนธ์ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 กรอบแนวคิดในการดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 Absolute ethanol (AR Grade) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

3.1.2 Acetic acid glacial (AR Grade) ยี่ห้อ QRec ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.3 Acetone (AR Grade) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

3.1.4 40% Acrylamide solution บริษัท Amersham biosciences ประเทศสวีเดน

3.1.5 Ammonium persulfate (APS) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.6 Ammonium sulfate ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.1.7 Antifoam (AR Grade) ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.8 Ascorbic acid ยี่ห้อ Rankem บริษัท RFCL ประเทศอินเดีย

3.1.9 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมัน

3.1.10 Boric acid บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.11 Bovine serum albumin (BSA) ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.12 Bromothymol blue ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.13 Calcium chloride dehydrate ยี่ห้อ Rankem บริษัท RFCL ประเทศอินเดีย

3.1.14 Celite 545 coarse ยี่ห้อ Fluka ประเทศสเปน

3.1.15 Cellulose dialysis bag (MW cut off 3.5 kDa) ยี่ห้อ Cellu Sep บริษัท Membrane Filtration Products จำกัด ประเทศแคนนาดา

3.1.16 Coomassie Brilliant Blue G250 ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.17 Copper sulfate pentahydrate ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.1.18 2,6-Dichlorophenolindophenol ยี่ห้อ Univar บริษัท Asia Pacific Specialty chemicals ประเทศออสเตรเลีย

3.1.19 3,4-Dihydroxy-DL-phenylalanine (DL-DOPA) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.20 3,5-Dinitrosalicylic acid ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

3.1.21 2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

3.1.22 Dodecyl sulfate sodium salt (SDS) ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.23 Ethanol 95% บริษัท เอส พี ไซน์ ประเทศไทย

3.1.24 Folin-Ciocalteu's reagent ยี่ห้อ Carlo Erba ประเทศฝรั่งเศส

3.1.25 Fructose standard (D-(-)-fructose) ยี่ห้อ Fluka ประเทศอิสราเอล

3.1.26 D-(+)-Galacturonic acid monohydrate ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสโลว์วาเกีย

3.1.27 Gallic acid ยี่ห้อ Fluka ประเทศสเปน

3.1.28 Glycerol ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.29 Glycine (Molecular biology grade) ยี่ห้อ vivantis

3.1.30 conc. Hydrochloric ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.31 *p*-Hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

3.1.32 Inulin from chicory ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.33 L-Ascorbic ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเดนมาร์ก

3.1.34 Linoleic acid ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมัน

3.1.35 Maleic acid ยี่ห้อ UNILAB บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.36 2-Mercaptoethanol ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.1.37 Metaphosphoric acid ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.38 Methanol (AR Grade) ยี่ห้อ QRec ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.39 2(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES hydrate) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.40 N,N'-methylenebisacrylamide (bisacrylamide) ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.41 N,N,N',N'-tetramethyethylenediamine (TEMED) ยี่ห้อ Fluka ประเทศเบลเยี่ยม

3.1.42 Pectin from citrus fruit ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศเดนมาร์ก

3.1.43 Peptone water ยี่ห้อ Conda ประเทศแอฟริกาใต้

3.1.44 Petroleum ether (AR Grade) ยี่ห้อ QRec บริษัท brightchem

3.1.45 Phenol ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน

3.1.46 Phosphate buffered saline; PBS (pH 7.4) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.47 85% Phosphoric acid ยี่ห้อ Carlo Erba บริษัท antibioticos ประเทศอิตาลี

3.1.48 Polyethylene glycol 6000 (PEG) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.49 Potassium dihydrogen phosphate ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.50 di-Potassium hydrogen phosphate ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.51 Potassium persulfate บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.52 Potassium sodium (+)-tartrate) บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.53 Sodium acetate hydrated บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.54 Sodium bisulfate ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.55 Sodium borohydride ยี่ห้อ Labchem บริษัท Asia Pacific Specialty chemicals ประเทศออสเตรเลีย

3.1.56 Sodium carbonate ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.57 Sodium chloride บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.58 tri-sodium citrate dihydrate ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.59 Sodium dihydrogen orthophosphate บริษัท Ajax Finechem ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.60 di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous บริษัท Ajax Finechem

3.1.61 Sodium hydroxide ยี่ห้อ BDH ประเทศอังกฤษ

3.1.62 Sodium hypochlorite (available chlorine 8.8%w/w) บริษัท วิทยาศรม ศรีราชา จำกัด

3.1.63 Standard marker ยี่ห้อ Bio Rad บริษัท Bio-Rad Laboratories

3.1.64 conc. Sulfuric acid (AR Grade) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

3.1.65 Trichloroacetic acid ยี่ห้อ BDH ประเทศเบลเยี่ยม

3.1.66 Tris(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) MB Grade ยี่ห้อ USB ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.67 Tween 20 ยี่ห้อ Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.1.68 ชุดวิเคราะห์ใยอาหารรวม (total dietary fibre assay kit; K-TDFR) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์

3.1.69 ชุดวิเคราะห์ฟรุคแทน (fructan assay kit; K-FRUC) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์

3.1.70 ชุดวิเคราะห์วิตามินซี (ascorbic acid assay kit; K-ASCO) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์

3.1.71 ชุดวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic count plate) ยี่ห้อ petrifilm บริษัท 3M จำกัด

3.1.72 ชุดวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count plate) ยี่ห้อ petrifilm บริษัท 3M จำกัด

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 Crucible (glasfilter) ยี่ห้อ ROBU ประเทศเยอรมัน

3.2.2 Electrophoresis set ยี่ห้อ ATTO รุ่น AE-6450 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.3 Hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO ประเทศญี่ปุ่น

3.2.4 Power supply ยี่ห้อ LKB bromma ประเทศสวีเดน

3.2.5 Transferpette ยี่ห้อ Brand ประเทศเยอรมัน

3.2.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ inolab รุ่น pH level 1

3.2.7 เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporation) ยี่ห้อ Buchi

3.2.8 เครื่องวัดสี รุ่น Utrascan XE บริษัท Hunter LAB

3.2.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 บริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (centrifuge) ยี่ห้อ Sorvall thermofisher รุ่น legend mach 1.6R ประเทศเยอรมัน

3.2.11 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) รุ่น TA.XT Plus บริษัท Micro stable system ประเทศสหราชอาณาจักร

3.2.12 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP110S บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน

3.2.13 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น BP303-L บริษัท Mettler toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.14 เครื่องบดอาหาร ยี่ห้อ Kenwood รุ่น CH180 ประเทศอังกฤษ

3.2.15 เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer) ยี่ห้อ Scaltec รุ่น SM001 ประเทศเยอรมัน

3.2.16 เครื่องทดสอบ Residual free chlorine ยี่ห้อ Palintest รุ่น interface photometer 7000

3.2.17 เครื่องผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.18 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น ED115 บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

3.2.19 ชุดเครื่องกลั่น (Kjeltec system) รุ่น 1022 Distilling unit บริษัท Tecator ประเทศเนเธอร์แลนด์

3.2.20 ชุดเครื่องสกัดไขมัน (extraction unit) รุ่น Soxtec system HT6 บริษัท Tecator ประเทศเนเธอร์แลนด์

3.2.21 เตาเผา (Muffe furnace) รุ่น ELF10/14 บริษัท Carbolite ประเทศอังกฤษ

3.2.22 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.2.23 เทอร์โมมิเตอร์

3.2.24 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น DC100 ประเทศเดนมาร์ก

3.2.25 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaking) รุ่น SBD 50BIO บริษัท Heto lab equipment ประเทศเดนมาร์ก

3.3 การศึกษาลักษณะเฉพาะของหัวแก่นตะวันที่ผู้บริโภครับรู้ได้และใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินคุณภาพในการบริโภคหัวแก่นตะวันสด

การศึกษาคำศัพท์ที่ผู้บริโภคใช้อธิบายลักษณะเฉพาะและใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินคุณภาพในการบริโภคหัวแก่นตะวันสด มีขั้นตอนในการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

3.3.1 การคัดเลือกตัวแทนผู้บริโภค

รับสมัครตัวแทนกลุ่มผู้บริโภคที่มีอายุระหว่าง 18-50 ปี ซึ่งคุณสมบัติของตัวแทนกลุ่มผู้บริโภคที่ผ่านการคัดเลือกมีอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ คือ (1) ผู้ที่เคยเลือกซื้อและบริโภคหัวแก่นตะวัน (2) ผู้ที่สนใจบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ (3) ผู้ที่เคยบริโภคพืชลำต้นใต้ดินที่ใกล้เคียงกับแก่นตะวัน เช่น ขมิ้นขาว แห้ว มันแกว แครอท และ (4) ผู้ที่บริโภคผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภคเป็นประจำ โดยการติดประกาศรับสมัครตามป้ายประชาสัมพันธ์บริเวณจุดประชาสัมพันธ์ต่างๆ ภายในมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งตัวแทนกลุ่มผู้บริโภคผ่านการคัดเลือกมีจำนวน 24 คนเป็นเพศชาย 12 คน และเพศหญิง 12 คน

3.3.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะของหัวแก่นตะวันที่ผู้บริโภครับรู้ได้และใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินคุณภาพในการบริโภคหัวแก่นตะวันสด

การศึกษาลักษณะที่ผู้บริโภคใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินคุณภาพในการบริโภคของหัวแก่นตะวันสด โดยใช้เทคนิค Free Choice Profiling (FCP) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.2.1 ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินโดยวิธี FCP ควรมีความหลากหลายทางลักษณะประสาทสัมผัส เพื่อให้ผู้ประเมินสามารถรับรู้และระบุลักษณะได้อย่างชัดเจน ในการประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสของหัวแก่นตะวันสดครั้งนี้จึงใช้ตัวอย่างหัวแก่นตะวันจำนวน 5 สายพันธุ์ และตัวอย่างพืชใต้ดินอีก 2 ชนิด เพื่อเพิ่มความหลากหลายทางลักษณะทางประสาทสัมผัส ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีจำนวน 7 ตัวอย่าง คือ แก่นตะวันสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ JA38, JA89, CN52867, HEL65 และ HEL68 จากโครงการวิจัยแก่นตะวัน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และตัวอย่างของพืชลำต้นใต้ดินจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ

มันแกวและแครอท ตัวอย่างในการทดสอบถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกไม่ปอกเปลือกสำหรับพิจารณาลักษณะคุณภาพด้านลักษณะปรากฏหรือกลิ่น และส่วนที่ 2 ปอกเปลือกสำหรับพิจารณาลักษณะคุณภาพด้านกลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส โดยตัวอย่างส่วนที่ 2 ตัดเป็นแท่งขนาดประมาณ 1 x 3 x 1 เซนติเมตร นำเสนอตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่างพร้อมกันด้วยแผนการนำเสนอแบบ Latin square design (MacFie and others 1989) โดยการใช้รหัสเลขสุ่ม 3 ตัวแทนชื่อตัวอย่างและลำดับในการนำเสนอตัวอย่างเป็นไปโดยสุ่ม เพื่อลดผลกระทบเนื่องจากลำดับของตัวอย่างที่นำเสนอต่อผู้ทดสอบและผลตกค้างจากตัวอย่างที่ถูกชิมก่อนหน้า

3.3.2.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะที่ผู้บริโภครับรู้ได้ของหัวแก่นตะวันสด

การสร้างคำศัพท์เพื่ออธิบายลักษณะของหัวแก่นตะวันสดประเมินโดยตัวแทนผู้บริโภคกลุ่มเป้าหมายที่ได้จากการคัดเลือกและมีคุณสมบัติตามข้อ 3.3.1 ผู้ประเมินแต่ละคนทำการประเมินตัวอย่างโดยพิจารณาตัวอย่างตามลำดับ โดยเริ่มจากการมอง ดม และชิม แล้วให้ระบุลักษณะทางประสาทสัมผัส (คำศัพท์) ที่รับรู้ได้ในตัวอย่างหัวแก่นตะวันสด สำหรับลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ใช้ในการประเมินทั้ง 4 ด้าน คือ ลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส โดยเป็นการระบุคำศัพท์ของผู้ประเมินแต่ละคนด้วยตนเอง จากนั้นให้ผู้ประเมินแต่ละคนทำการประเมินความเข้มในแต่ละลักษณะของผลิตภัณฑ์ โดยระบุระดับความเข้มของแต่ละตัวอย่างในแต่ละลักษณะทางประสาทสัมผัสนั้น โดยขีดเส้นลงบนสเกล ซึ่งสเกลที่ใช้ในการทดสอบเป็น unstructure line scale ความยาว 15 เซนติเมตร ก่อนเปลี่ยนตัวอย่างในการทดสอบแต่ละครั้งให้ผู้ประเมินรับประทานแครกเกอร์จืดและบ้วนปากด้วยน้ำเปล่าสะอาด เพื่อลดรสชาติตกค้างภายในปาก

3.3.2.3 การวิเคราะห์ผังโครงร่างทางประสาทสัมผัสและผังการรับรู้ผลิตภัณฑ์

นำลักษณะทางประสาทสัมผัสและค่าระดับความเข้มที่ได้จากการประเมินในข้อ 3.3.2.2 ของผู้ประเมินจำนวน 24 คนมาวิเคราะห์ผังโครงร่างทางประสาทสัมผัสและผังการรับรู้ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Generalised Procrustes Analysis (GPA) โดยใช้โปรแกรม XLstat (Addinsoft 2007)

3.4 การศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ และกลุ่มเอนไซม์ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะคุณภาพในหัวแก่นตะวันสด

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ในการวิจัยขั้นตอนนี้ใช้แก่นตะวันสายพันธุ์ HEL65 จากแปลงทดลองโครงการวิจัยแก่นตะวัน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

นำหัวแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL65 ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวหลังการปลูก 120 วัน คัดเลือกหัวที่สมบูรณ์ ไม่เน่าเสีย ไม่มีรอยแผลหรือตำหนิ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2 เซนติเมตร ความยาว 6-8 เซนติเมตร และน้ำหนักต่อหัวของหัวแก่นตะวัน 25-50 กรัม นำหัวแก่นตะวันสดมาล้างทำความสะอาดเพื่อล้างดินและสิ่งสกปรกที่ตกค้างในอ่างน้ำล้น มีการถ่ายน้ำ 3 ครั้งจนหัวแก่นตะวันสะอาด จากนั้นแช่หัวแก่นตะวันในสารละลายไฮโปคลอไรด์ที่มีปริมาณคลอรีนอิสระ 100-120 ppm นาน 30 นาที และล้างด้วยน้ำสะอาดที่มีปริมาณคลอรีนอิสระ 5 ppm โดยใช้อัตราส่วนหัวแก่นตะวันต่อน้ำสะอาดประมาณ 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 5 ลิตร นำขึ้นจากน้ำและใช้พัดลมเป่าให้สะเด็ดน้ำ ภาพที่ 3.2 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหัวแก่นตะวัน

คัดเลือกหัวแก่นตะวัน
ที่ปราศจากรอยแผล ตำหนิหรือการเน่าเสีย
↓
คัดเลือกขนาดของหัวแก่นตะวันที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (1-2 ซม.)
ความยาว (6-8 ซม.) และน้ำหนักต่อหัวของหัวแก่นตะวัน (25-50 กรัม)
↓
ล้างหัวแก่นตะวันโดยแช่ในน้ำสะอาดในอ่างน้ำล้น
↓
แช่ในสารละลายไฮโปคลอไรต์ที่มีที่มีปริมาณคลอรีนอิสระ 100-120 ppm นาน 30 นาที *
↓
ล้างด้วยน้ำสะอาดที่มีปริมาณคลอรีนอิสระ 5 ppm *
↓
ใช้พัดลมเป่าให้สะเด็ดน้ำ
↓
บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนความหนา 0.09 มม. ถุงละประมาณ 1 กิโลกรัม
↓
นำไปทดลองศึกษาต่อไป

* ใช้อัตราส่วนหัวแก่นตะวันต่อสารละลายไฮโปคลอไรด์เท่ากับ 1 กิโลกรัมต่อ 5 ลิตร

ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างหัวแก่นตะวัน

นำหัวแก่นตะวันที่เตรียมจากข้อ 3.4.1 มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมี และปริมาณจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของหัวแก่นตะวันที่นำมาศึกษาโดยทำการวิเคราะห์ลักษณะต่อไปนี้

3.4.2 ลักษณะทางกายภาพ

3.4.2.1 ค่าสี วัดค่าสีในระบบ CIE (L* a* b*) โดย L* คือ ค่าความสว่าง a* คือ ค่าความเป็นสีแดง และ b* คือ ค่าความเป็นสีเหลือง รวมทั้งวิเคราะห์ค่า ΔE* (สมการที่ 1) โดยใช้เครื่อง Hunter Lab รุ่น Ultrascan XE (Hunter Associates Laboratory; USA) ใช้แหล่งแสง D65

$$\Delta E^* = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2} \quad \text{..... (1)}$$

3.4.2.2 การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส วิเคราะห์ความแน่นเนื้อของหัวแก่นตะวันสด โดยเครื่อง Texture analyzer รุ่น TAXT2 Plus (Stable Micro System; UK) โดยวัดตัวอย่างหัวแก่นตะวันทั้งที่ยังมีผิวเปลือก ใช้วิธีการวัดแบบการเจาะทะลุ (puncture test) (Sefa-Dedeh and Afoakwa 2002) กำหนดระยะการเคลื่อนที่ของหัววัดทะลุผ่านหัวแก่นตะวัน 5 มิลลิเมตร โดยใช้หัววัดแบบทรงกระบอก (cylinder probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร (P/3) วัดความแน่นเนื้อบนตัวอย่างหัวแก่นตะวัน 3 จุด ตามแนวความยาวของหัวแก่นตะวัน

3.4.3 ลักษณะทางทางเคมี

3.4.3.1 ปริมาณความชื้น (AACC 2000, 44-15A)

3.4.3.2 ปริมาณโปรตีน (AOAC 1999, 920.152)

3.4.3.3 ปริมาณเถ้า (AOAC 1999, 940.26)

3.4.3.4 ปริมาณไขมัน (AOAC 1999, 954.02)

3.4.3.5 ปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ และเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป K-TDFR (Megazyme International, Ireland) ซึ่งอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์จาก AOAC 991.43

3.4.3.6 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) (AOAC 1999, 981.12)

3.4.3.7 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (Baldini and others 2004)

3.4.3.8 สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Queiroz and others 2009)

3.4.3.9 กิจกรรมการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยวิธี 2, 2–diphenyl-1-pieryl hydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay และ 2,2′-Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation decolorization assay (ดัดแปลงจาก กันยนา กรณ์เกษม 2548)

3.4.3.10 ปริมาณวิตามินซี โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป K-ASCO (Megazyme International, Ireland) วิเคราะห์การดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร

3.4.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณฟรุคแทน (Fructo-oligosaccharide and fructan polysaccharide) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป K-FRUC (Megazyme International, Ireland) ซึ่งอ้างอิงวิธีการวิเคราะห์จาก AOAC 999.03 และ AACC 32.32

3.4.4 ลักษณะทางจุลินทรีย์

ชั่งตัวอย่างแก่นตะวันในข้อ 3.4.1 จำนวน 25 กรัม เติม 0.1% peptone water ปริมาตร 225 มล. (ระดับการเจือจาง 10^{-1}) นำไปตีปั่นด้วย stomacher นาน 2 นาที เจือจางระดับความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยใช้อัตราส่วน 1:1 (1+9) dilution ใน 0.1% peptone water เจือจางถึงระดับ 10^{-6}

3.4.4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ปิเปตสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.4.4 ปริมาตร 1.0 มล. ในแต่ละ dilution ใส่ลงบนแผ่นเพาะเชื้อสำเร็จรูป (3M Petrifilm) ปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงอย่างระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นวางตัวกด (spreader) โดยให้ด้านที่มีขอบคว่ำหน้าลงสัมผัสแผ่นฟิล์มแผ่นบนให้ส่วนวงกลมครอบบริเวณที่หยดตัวอย่าง กดเกลี่ยให้ทั่วจนตัวอย่างกระจายเต็มวง ยกตัวกดขึ้น รอ 1-2 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว นำไปบ่มที่ 48±2 ชม. ที่ 35°ซ และตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ โดยนับโคโลนีที่เป็นสีแดงทั้งหมด ทั้งที่เป็นโคโลนีเล็กหรือใหญ่ สีเข้มหรือสีจาง ช่วงการนับที่เหมาะสม คือ 30-300 โคโลนี รายงานผลในรูป colony forming unit (CFU)/g

3.4.4.2 ปริมาณยีสต์และราทั้งหมด

ปิเปตสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.4.4 ปริมาตร 1.0 มล. ใส่ลงบนแผ่นเพาะเชื้อสำเร็จรูป (3M Petrifilm) ปล่อยแผ่นฟิล์มแผ่นบนลงอย่างระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นวางตัวกด โดยให้ด้านที่มีขอบคว่ำหน้าลงสัมผัสแผ่นฟิล์มแผ่นบนให้ส่วนวงกลมครอบบริเวณที่หยดตัวอย่าง กดเกลี่ยให้ทั่วจนตัวอย่างกระจายเต็มวง ยกตัวกดขึ้น รอ 1-2 นาที เพื่อให้เนื้อเจลแข็งตัว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน โดยนับเชื้อยีสต์ในวันที่ 3 และเชื้อราในวันที่ 5 ของการบ่ม ลักษณะโคโลนีของยีสต์ คือ โคโลนีขนาดเล็กมีขอบเขตชัดเจนสีเขียวอมฟ้า ส่วนลักษณะโคโลนีของเชื้อรา คือ โคโลนีขนาดใหญ่ ขอบโคโลนีไม่ชัดเจน มีหลากหลายสีขึ้นกับชนิดของรา และมีจุดโฟกัสกึ่งกลางโคโลนี ช่วงการนับที่เหมาะสม คือ 15-150 โคโลนี รายงานผลในรูป colony forming unit (CFU)/g

3.4.6 การศึกษากลุ่มโปรตีนที่อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะคุณภาพในหัวแก่นตะวันสด

การศึกษากลุ่มโปรตีนที่อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหัวแก่นตะวัน โดยเปรียบเทียบมวลโมเลกุลของโปรตีนที่แยกได้กับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

3.4.6.1 การสกัดและการตกตะกอนโปรตีน

นำตัวอย่างแก่นตะวันในข้อ 3.4.1 มาสกัดโปรตีน โดยลดขนาดของชิ้นตัวอย่างและทำการบดตัวอย่างจำนวน 50 กรัม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2 จำนวน 100 มล. ซึ่งมีกรดแอสคอร์บิค 50 มิลลิโมลาร์ ผสมร่วมด้วย บดนาน 2 นาที กรองกากตะกอนออกผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใส (supernatant) ได้สารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ (crude extract) นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่การอิ่มตัวร้อยละ 100 (ดัดแปลงจาก Ziyan and Pekyardimci 2003) จากนั้นทำการไดอะไลซีสแยกเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมเจือจาง 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ถุงไดอะไลซีสที่มี molecular weight cut off 3.5 kDa นำตัวอย่างตะกอนที่ได้ไปแยกกลุ่มของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

3.4.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry and others 1951) โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.4.6.3 การแยกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

นำตัวอย่างตะกอนโปรตีนจากข้อ 3.4.6.1 มาแยกกลุ่มของโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่ 10% polyacrylamide gel โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 50 mA ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 V ย้อมสีแผ่นเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue G250 (Laemmli 1970, *cited in* Tangwongchai and others 2000) วิเคราะห์มวลโมเลกุลของแถบโปรตีนที่แยกได้โดยเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลของแถบโปรตีนมาตรฐาน (standard marker) จากการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างระยะทาง (Rf) ในการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐาน (แกน x) และ $\log_{10}$ ของมวลโมเลกุล (แกน y) โดยโปรตีนมาตรฐานประกอบด้วย Myosin (195 kDa), β-Galactosidase (104 kDa), Bovine serum albumin (59 kDa), Ovalbumin (42 kDa), Carbonic anhydrase (28 kDa), Soybean trypsin inhibitor (21 kDa), Lysozyme (15 kDa) และ Aprutinin (6.5 kDa)

3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหัวแก่นตะวันสด

นำหัวแก่นตะวันสดจากข้อ 3.4.1 บรรจุลงในถุงพอลิเอทิลีนขนาด 20 x 25 เซนติเมตร ความหนา 0.09 มิลลิเมตร น้ำหนักบรรจุถุงละ 1 กิโลกรัม ปิดผนึก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 4°ซ และ -18 °ซ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ -18 °ซ นำหัวแก่นตะวันไปแช่เยือกแข็งด้วยลมเย็นอุณหภูมิ -35°ซ ก่อนการนำไปเก็บรักษา และนำมาละลายน้ำแข็งก่อนการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิประมาณ 4°ซ นานประมาณ 24 ชั่วโมง (Martins and Silva 2004) สุ่มตัวอย่างแก่นตะวันทุกสัปดาห์มาวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เคมี กิจกรรมของเอนไซม์ และจุลินทรีย์เป็นระยะเวลาต่อเนื่องนาน 10 สัปดาห์

3.5.1 ลักษณะด้านกายภาพ

3.5.1.1 การวิเคราะห์ค่าสี ในระบบ CIE (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1)

3.5.1.2 การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2)

3.5.1.3 การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss; ดัดแปลงจาก Lichanporn and others 2009) ตัวอย่างแก่นตะวันที่ -18°ซ ไม่ละลายน้ำแข็งก่อนการวิเคราะห์

3.5.2 ลักษณะด้านเคมี

3.5.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Baldini and others 2004)

3.5.2.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) (AOAC 1999, 981.12)

3.5.2.3 ปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ และเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.5)

3.5.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟรุคแทน (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.11)

3.5.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ของหัวแก่นตะวันสดในระหว่างการเก็บรักษา

เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และปริมาณอินนูลินในหัวแก่นตะวัน โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไปนี้

3.5.3.1 เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

3.5.3.2 เอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส

3.5.3.3 เอนไซม์ลิพอกซิจิเนส

3.5.3.4 เอนไซม์อินนูลิเนส

3.5.3.1 การสกัดเอนไซม์

(1) การสกัดเอนไซม์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ลิพอกซิจิเนส และอินนูลิเนส

(ดัดแปลงจาก Ziyan and Pekyardimci 2003)

สุ่มตัวอย่างหัวแก่นตะวันที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละสัปดาห์ (ข้อ 3.5) จำนวน 50 กรัม มาหั่นลดขนาด เติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีกรดแอสคอบิค 50 มิลลิโมลาร์ และพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) ร้อยละ 10 ผสมร่วมด้วย และบดปั่นตัวอย่างเป็นเวลา 2 นาที กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบางหนา 2 ชั้น นำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 x g ที่ 4°ซ นาน 30 นาที สารละลายที่ได้เป็นสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

(2) การสกัดเอนไซม์สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส (ดัดแปลงจาก Pires and Finardi-Filho 2005)

สุ่มตัวอย่างหัวแก่นตะวันที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละสัปดาห์ (ข้อ 3.5) จำนวน 50 กรัม มาหั่นลดขนาด เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 50 มล. บดปั่นตัวอย่างเป็นเวลา 2 นาที ปรับความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างเป็น 7.5 และหมุนกวนโดยใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองตัวอย่างผ่านผ้าขาวบางหนา 2 ชั้น นำสารละลายที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 x g ที่ 4°ซ นาน 30 นาที สารละลายที่ได้เป็นสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

3.5.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

นำสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบที่ได้ในข้อ 3.5.3.1 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไปนี้

(1) เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส วิเคราะห์การเกิดสารประกอบ DOPA quinone ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจากสับสเตรท DL-DOPA โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ปริมาตร 1.8 มล. และสารละลาย DOPA ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 4 มก./มล. ปริมาตร 1 มล. และสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.2 มล. สำหรับการวิเคราะห์ blank ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนสารสกัดเอนไซม์ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลามากกว่า 10 นาที (ดัดแปลงจาก Gomes and Ledward 1996) ทั้งนี้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอล

ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.001 ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (*ca* 25±2 °ซ) (Ho 1999)

(2) เอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส วิเคราะห์กรดเพคติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส โดยใช้เพคตินเป็นสับสเตรท และใช้สารละลายบรอมโมไธมอลบลูเป็นอินดิเคเตอร์ วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลายเพคตินความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (ความเป็นกรดด่าง 7.5) ปริมาตร 2 มล., สารละลายบรอมโมไธมอลบลูความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 0.15 มล., น้ำกลั่นปริมาตร 0.55 มล. และสารสกัดเอนไซม์อย่างหยาบ 0.3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเข้มข้นหมู่คาร์บอกซิลที่เกิดเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส โดยใช้สารละลายกรดกาแลคทูโรนิคเป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอร์เรส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต galacturonic acid 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (*ca* 25±2 °ซ) (ดัดแปลงจาก Tangwongchai and others 2000)

(3) เอนไซม์ลิพอกซิจิเนส วิเคราะห์ conjugated diene ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ลิพอกซิจิเนส โดยใช้กรดลิโนเลอิคเป็นซับสตรท โดยนำกรดลิโนเลอิคความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเอทานอล จำนวน 7.1 มล. และ Tween-20 จำนวน 0.2 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการระเหยเอทานอลออกภายใต้สุญญากาศ นำส่วนที่เหลือหลังการระเหยมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. และปรับความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก สารละลายที่ได้ใช้เป็น stock solution ของสับสเตรท วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเติมสารละลายสับสเตรท 3.6 มล. และสารสกัดเอนไซม์ตัวอย่างอย่างหยาบเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 0.15 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงทุก 30 วินาที (ดัดแปลงจาก Tangwongchai and others 2000) ทั้งนี้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ลิพอกซิจิเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป 0.001 ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (*ca* 25± 2°ซ) (Isamah 2004)

(4) เอนไซม์อินนูลิเนส วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวิธี 3,5-dinitro salicylic acid (Miller 1959) ใช้สารละลายอินนูลินร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์อะซีเทตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 เป็นสับสเตรท วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และใช้สารละลายฟรุคโตสเป็นสารมาตรฐาน ทั้งนี้ 1 หน่วยของ

กิจกรรมเอนไซม์อินนูลิเนส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตฟรุคโตส 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (*ca* 25±2 °ซ) (Chen and others 2009)

3.5.4 ลักษณะด้านจุลินทรีย์

3.5.4.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.1)

3.5.4.2 ปริมาณยีสต์และราทั้งหมด (เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2)

3.5.5 การวางแผนการทดลอง

ในขั้นตอนนี้วางแผนการทดลองแบบ split-plot โดยมีระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็น main plot และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็น subplot ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance; ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows version 17 (SPSS Inc., USA)