

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

มะม่วงพันธุ์เขียวเสวยที่มีระยะความแก่ทางการค้า จากตลาดสี่มุมเมือง คัดเลือกผลที่มีขนาดน้ำหนักใกล้เคียงกันประมาณ 350-370 กรัม ปราศจากโรค แมลง และ ตาหนิ คัดเลือกผลให้มีค่าความถ่วงจำเพาะใกล้เคียงกันโดยใช้วิธีจมในน้ำ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 ± 1 องศาเซลเซียสและทำการทดลองในวันรุ่งขึ้น



ภาพที่ 3.1 มะม่วงพันธุ์เขียวเสวยที่มีความแก่ทางการค้า

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 2 ตำแหน่ง (Digital balance; Mettler Toledo รุ่น PB 1502-L)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Digital balance; Mettler Toledo รุ่น PB 1502-L)
3. เครื่องวัดสี (Colorimeter Minolta รุ่น CR 400)
4. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส(Texture Analyzer; Stable Micro Systems รุ่น TAX2I)
5. Hot plate
6. กล้องดิจิทัล
7. กล่องพลาสติกใส มีฝาปิด (PET)

8. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Digital Refractometer รุ่น PAL-1, ATAGO, Tokyo, Japan)
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter รุ่น inoLab Level 1)
10. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Cooling, Sanyo รุ่น MIR-253)
11. ขวดโหล

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมอัลจิเนต (Food Grade)
2. เจลแลนกัม (Food Grade)
3. กรดแอสคอร์บิก (CARLO ERBA REAGENTI)
4. แคลเซียมคลอไรด์
5. กลีเซอรอล (CARLO ERBA REAGENTI)
6. น้ำมันดอกทานตะวัน (ยี่ห้อ มรกต)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์
8. โซเดียมไฮโปคลอไรด์
9. แคลเซียมคลอไรด์
10. น้ำกลั่น
11. ฟีนอล์ฟทาลีน
12. Sodium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem)
13. Di-Sodium hydrogen orthophosphate (Ajax Finechem)
14. Pyrocatechol (Merck)
15. Metaphosphoric acid (Merck)
16. Sulfuric acid (RCI Labscan)
17. Tartaric acid (Merck)
18. Potassium dihydrogen phosphate (Merck)
19. Plate Count Agar (PCA) (Himedia)
20. Potato dextrose agar (PDA) (Himedia)

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมผลมะม่วงเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกของผลมะม่วง

จุ่มผลมะม่วงในสารละลายกรดโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ใช้อัตราส่วนผลมะม่วง 1 ผลต่อสารละลาย 0.5 ลิตร (Narciso and Plotto, 2005)



ภาพที่ 3.2 การเตรียมผลมะม่วงเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เปลือกของผลมะม่วง

3.4.2 วิธีการเตรียมสารเคลือบผิวด้วยเทคนิคไมโครอิมัลชัน

เตรียมสารเคลือบของอัลจิเนต 2 % (w/v) และ เจลแลนกัม 0.5% (w/v) โดยวิธีไมโครอิมัลชันชนิด เติมน้ำลงในแว็กซ์ (water to wax) ตามวิธีของ Tapia และ คณะ (2008) ละลายอัลจิเนต หรือเจลแลนกัม เติมน้ำกลั่นที่ละน้อย ๆ ให้ความร้อนแก่อัลจิเนต หรือ เจลแลนกัม ที่อุณหภูมิ 70°C และคนให้เข้ากันอย่าง รวดเร็วด้วยเครื่องปั่นจนหลอมเหลว แล้วจึงเติมกลีเซอรอลในอัตราส่วน 0.25% ถึง 2% (w/v) และเติมน้ำมัน ดอกทานตะวันความเข้มข้น 0.025 % (w/w) (วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken ค่าแสดง ณ ตาราง ภาคผนวกที่ 1 และ 2) จะได้สารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมแตกต่างกัน

3.4.3 การเตรียมมะม่วงตัดแต่งพร้อมบริโภค

ปอกเปลือกมะม่วงและหั่นชิ้นเนื้อมะม่วง ออกเป็นด้านละ 4-6 ชิ้นนำมาผสมคลุกกันจุ่มชิ้นมะม่วงใน สารเคลือบผิวที่เตรียมจากข้อ 3.5.2 นาน 2 นาที แล้วจึงนำมาจุ่มต่อในสารละลายที่มีอัตราส่วนของแคลเซียม

คลอไรด์ 2 % (w/v) ที่มีแอสคอร์บิกในอัตราส่วน 1 % และ 2% (w/v) นาน 2 นาที แล้วจึงบรรจุขึ้นมะม่วงใน
กล่องพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 1 และ 10 ± 1 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.3 การเคลือบผิวมะม่วงตัวแต่งพร้อมบริโภค



ภาพที่ 3.4 บรรจุขึ้นมะม่วงในกล่องพลาสติก PET

3.5 การศึกษาที่ 1 หาสารเคลือบผิวที่เหมาะสมในการเคลือบมะม่วงเขียวเสวยตัดแต่งพร้อมบริโภค

ในขั้นตอนการศึกษานี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อย คือ

1. การหาปริมาณของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นพลาสติกไฮเซอร์และปริมาณของกรดแอสคอร์บิกที่เติมลงไปเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยพิจารณาจากค่า Water vapor Resistance (WVR) ตามวิธีการหาค่า WVR ของ Garcia and Zaritzky (1998)
2. การหาปริมาณของน้ำมันดอกทานตะวันที่เหมาะสมมีเติมลงไปในสารเคลือบผิวที่ได้จากอัลจินตและเจลแลนกัน โดยพิจารณาจากค่า Water vapor Resistance (WVR) ตามวิธีการหาค่า WVR ของ Garcia and Zaritzky (1998)
3. วิเคราะห์ผลการทดลองและพิจารณาสารเคลือบผิวที่เหมาะสมมาใช้ศึกษาผลของสารเคลือบผิวนั้น ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษามะม่วงเขียวเสวยตัดแต่งพร้อมบริโภค



ภาพที่ 3.5 การหา Water vapor Resistance (WVR)

3.6 การศึกษาที่ 2 ศึกษาผลของสารเคลือบผิวที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษามะม่วงเขียวเสวยตัดแต่งพร้อมบริโภค

เตรียมผลมะม่วงตามวิธีการในข้อ 3.4.1 และ 3.4.3 แช่ชิ้นมะม่วงในสารเคลือบผิวที่คัดเลือกจากการศึกษาที่ 1 บรรจุเนื้อมะม่วงหั่นชิ้นลงในกล่องพลาสติกจำนวน 10 ชิ้นต่อกล่องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 ± 1

และ 10 ± 1 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงหั่นชิ้น มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในวันเริ่มต้นและระหว่างการเก็บรักษาทุกๆ 2 วันเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จนกระทั่งสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา โดยทำการวิเคราะห์ดังนี้

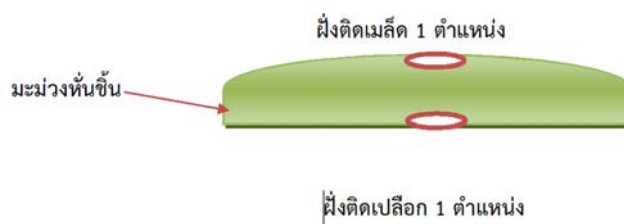
3.6.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักเนื้อมะม่วงก่อนและหลังการเก็บรักษานำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา} \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}}$$

3.6.2 การเปลี่ยนแปลงสีของชิ้นเนื้อมะม่วง

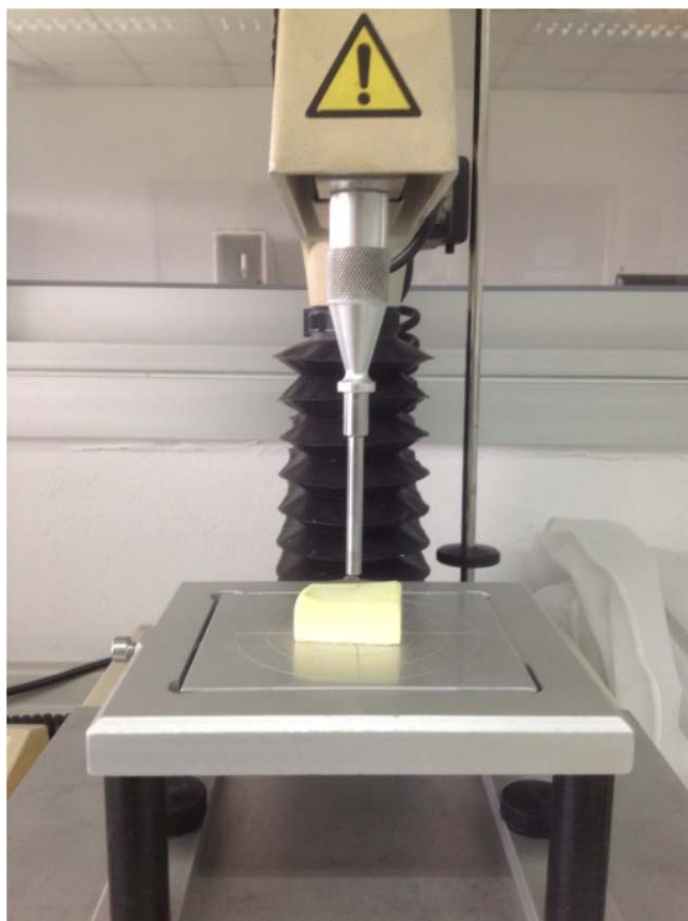
มะม่วง 1 ชิ้น ทำการวัดสีเนื้อมะม่วงด้านที่ติดกับเปลือก และ ด้านที่ติดกับเมล็ด ผึ่งละ 1 ตำแหน่ง โดยใช้เครื่องวัดสี (Colorimeter Minolta รุ่น CR 400) (ภาพที่ 3.6) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชิ้น นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและรายงานผลที่วัดได้เป็นค่า L^* , a^* , b^* และ ΔE



ภาพที่ 3.6 การวัดสีของเนื้อมะม่วงหั่นชิ้น

3.6.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัสของชั้นเนื้อมะม่วง

วัดความแน่นเนื้อของเนื้อมะม่วงด้านติดเปลือกชั้นละ 1 ตำแหน่งด้วยเครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) ดัดแปลงจากวิธีของ Tapia และ คณะ (2008) โดยใช้หัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (5 mm-diameter probe) ความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที (ภาพที่ 3.7) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ชั้นค่าแรงกดที่วัดได้มีหน่วยเป็นนิวตันนำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย



ภาพที่ 3.7 การวัดความแน่นเนื้อของเนื้อมะม่วงหั่นชิ้น

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid)

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วิเคราะห์โดยทำการคั้นน้ำมะม่วงและกรองแยกกากออก หยดน้ำมะม่วงที่คั้นได้ลงบน digital refractometer: Atago รุ่น PAL-1 ทำการอ่านและบันทึกค่าที่ได้ (ภาพที่ 3.8)



ภาพที่ 3.8 การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

3.6.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่าพีเอช, pH)

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันมาวัดค่าพีเอช (อาจเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดแล้วลงไปเล็กน้อยเพื่อเจือจางแล้วนำมาวัดค่าพีเอช) โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้งตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องวัดโดยการใช้น้ำสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 4.0, 7.0 และ 10.0 ตามลำดับทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย

3.6.6 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Total titratable acidity, TA)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในเนื้อมะม่วงโดยวิธีไทเทรชันด้วยสารละลายด่างมาตรฐานและคำนวณผลในรูปของกรดซิตริกต่อ 100 กรัมเนื้อมะม่วง (AOAC method 942.15, 2000)

3.6.7 อัตราส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (TSS/TA)

คำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง TSS และ TA ที่วิเคราะห์ได้

3.6.8 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidase; PPO)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส วัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในตัวอย่างเนื้อมะม่วงในระหว่างการเก็บรักษา ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) นำเนื้อมะม่วงไปสกัดเอนไซม์ และวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอล ออกซิเดส โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายซับสเตรต ได้แก่ สารละลายไพโรแคทีคอล

ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทันที ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านค่าทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 2 นาที นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟอสฟอไรเลส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่า pH = 7.0

3.6.9 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Pate Count) (AOAC, 2000)

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดทั้งหมด วิเคราะห์โดยการชั่งน้ำหนักตัวอย่างมะม่วงตัดแต่งพร้อมบริโภคน้ำตาลแต่ละสภาวะ ตัวอย่างละประมาณ 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกสำหรับเข้าเครื่องตีปั่น ด้วยวิธี aseptic technique เติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วย stomacher จนตัวอย่างกระจายจนทั่ว ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง $1:10$ (10^{-1}) ปิเปตตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 10^{-1} มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง 10^{-2} จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 10^{-2} มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาสำหรับเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะได้ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง 10^{-3} ทำการหอยอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ด้วยไมโครเวฟจนอุ่นละลายจนหมด พักไว้ให้เย็นซักครู่จึงนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วในแต่ละระดับการเจือจาง (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน เทอาหาร PCA ประมาณ 10 มิลลิลิตร ทับบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาจานและทำการเขย่า/หมุนวนจานจนอุ่นอาหารแผ่กระจายจนทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอุ่นอาหารแข็งดีแล้ว ทำการคว่ำจานแล้วนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับและรายงานผลในหน่วย log cfu/g

3.6.10 การทดสอบการยอมรับของผู้ทดสอบหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ทดสอบการยอมรับของผู้ทดสอบ ด้วยวิธีการหาอัตราความชอบ สเกลการยอมรับ 1 ถึง 9 (9 – point hedonic scaleing) ใช้จำนวนผู้ทดสอบ 30 คน