

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี Color Quest II Sphere (Chroma Meter CR 300 Series, Japan)
2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Mettler, USA)
3. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer: UV WINLAB version 2.85.04, Perkin ElmerTM, UK)
4. แถบวัดพีเอชอินดิเคเตอร์ (pH indicator “PANPEHA”, Aldrich Chemistry)
5. เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (Diamon DSC, Perkin ElmerTM, USA)
6. เครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TGA) (Perkin ElmerTM, USA)
7. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดย Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
8. เครื่องเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (Vernier Calipers)
9. พลาสติก nylon/LLDPE ขนาด 50 ไมครอน
10. กระดาษกรอง (filter paper Whatman No.1)

สารเคมี

1. แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase 250 UN, A2404, Sigma)
2. เปอร์ออกซิเดส (peroxidase 25 KU, P8125, Sigma)
3. สีย้อม 2,6-ไดคลอโรอินโดฟีโนล (2,6-Dichlorophenol indophenol so.salt 5g, 3291, Loba)
4. เอทานอล (ethanol absolute HDPE 2.5L#100983, Merck)
5. เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose)
6. ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส (hydroxypropyl methylcellulose: HPM)
7. โพลีเอทิลีนไกลคอล-400 (polyethylene glycol-400)

วิธีดำเนินการวิจัย

1) การศึกษาสูตรและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์และเอทานอล

1.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ที่เก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้แบบดัดแปลงบรรยากาศ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทำการคัดเลือกมะม่วงสำหรับการทดลอง โดยนำผลมะม่วงน้ำดอกไม้ดิบมาตัดให้มีขนาดของผลใกล้เคียงกัน แล้วนำมาตัดแยกระยะความแก่อ่อน โดยใช้ความถ่วงจำเพาะเป็นดัชนีความแก่ของผลมะม่วง โดยทำการตัดเอาเฉพาะมะม่วงที่จมในน้ำ แล้วนำมาล้างน้ำสะอาด 2 ครั้ง ผึ่งให้ผิวของผลมะม่วงแห้ง จากนั้นทำการบรรจุผลมะม่วงลงในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศ โดยทำการศึกษาการดัดแปลงบรรยากาศ 5 การทดลอง ซึ่งทำการเจาะรูบรรจุภัณฑ์ 5 แบบ คือ เจาะให้มีจำนวนรู 2, 4, 6, 8 และ 10 รู หลังจากนั้นทำการติดแถบพีเอชอินดิเคเตอร์ภายในบรรจุภัณฑ์ และปิดผนึก เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชของบรรยากาศ

ภายในบรรจุภัณฑ์ที่เก็บรักษามะม่วง โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของพีเอชอินดิเคเตอร์ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการจดบันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของพีเอชอินดิเคเตอร์ทุกวัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test (DMRT) แล้วคัดเลือกค่าพีเอชของสภาวะบรรยากาศภายในบรรจุภัณฑ์ที่เก็บรักษามะม่วงน้ำดอกไม้แบบตัดแปลงบรรยากาศ ที่เหมาะสมสำหรับทำการศึกษาสูตร และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์และเอทานอล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทำการเตรียมพีเอชอินดิเคเตอร์ทำโดยการตัดแถบวัดพีเอชอินดิเคเตอร์ ช่วง 0-14 ออกเป็นชิ้นๆ ชิ้นละ 1 ค่าพีเอช แล้วจุ่มแถบวัดพีเอชลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 M ที่มีค่าพีเอช 7.5 จากนั้นผึ่งให้แห้ง และนำไปติดบนแผ่นกาวสองหน้า แล้วนำไปติดในบรรจุภัณฑ์ตัดแปลงบรรยากาศที่เตรียมไว้

1.2 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์และเอทานอล

ทำการศึกษาปริมาณเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์และเอทานอล โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Bazana et al. (1989) ซึ่งการศึกษานี้ได้ใช้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส 3 ระดับคือ 3.2, 6.3 และ 9 μg และความเข้มข้นของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส 2 ระดับคือ 20 และ 29 μg ร่วมกับสารละลาย DCIP 2 ระดับ คือ 0.1 และ 0.05 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 M. ที่พีเอช 7.5 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำการทดลองโดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส และเปอร์ออกซิเดส ผสมกับ DCIP ตามความเข้มข้นที่กำหนด ปริมาณ 1.5 mL ลงในหลอดทดลอง จากนั้นดูผลละลายเอทานอล 1000 ppm. ปริมาณ 0.5 mL ลงในหลอดทดลองเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที

การศึกษานี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวางแผนการทดลองแบบ $2 \times 2 \times 3 \times 6$ factorial in CRD (Completely Randomize Design) จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test (DMRT) ทำการคัดเลือกสูตรและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์และเอทานอล แล้วนำสูตรและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ ไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและกิจกรรมของเอ็นไซม์ในตอนต่อไป

2) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและกิจกรรมของเอ็นไซม์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและกิจกรรมของเอ็นไซม์ ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Bazana et al. (1989) โดยใช้ปริมาณเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส และสารละลาย DCIP ที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองในข้อ 1.2 โดยผันแปรความเข้มข้นของเอทานอล 6 ระดับ คือ 1000, 800, 600, 400, 200 และ 100 ppm. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3) การศึกษากรรมวิธีการผลิตแถบซีวัดเอทานอล

ส่วนผสมของเอ็นไซม์ที่ใช้กับแถบซีวัด ได้ปรับจากสูตรที่ได้จากการศึกษาในสารละลาย (ตอนที่ 1.2) ดังนี้ ใช้เอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส 9.0 μg ., เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส 29.0 μg . และความเข้มข้นของสีย้อม DCIP 1 M และ 2 M ทำการเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ และสีย้อม DCIP ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 M. ที่พีเอช 7.5 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

การศึกษาการผลิตแถบซีวัดเอทานอล ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแถบซีวัด ที่ทำจากวัสดุ 2 ชนิด ได้แก่ ฟิล์มเมทิลเซลลูโลส และแผ่นดูดซับ ซึ่งมีรายละเอียดการเตรียม ดังนี้

3.1 การผลิตแถบซีวัดเอทานอลโดยใช้ฟิล์มเมทิลเซลลูโลส

ส่วนผสมของฟิล์มเมทิลเซลลูโลส คือ เมทิลเซลลูโลส โฟโพลีนไกลคอล-400 ไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส น้ำกลั่น และสารละลายอินดิเคเตอร์

ทำการเตรียมฟิล์มเมทิลเซลลูโลส โดยทำการละลายเมทิลเซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 2.3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โฟโพลีนไกลคอล-400 เข้มข้นร้อยละ 2 (ปริมาตร/ปริมาตร) และไฮดรอกซีเมทิลเซลลูโลส เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำกลั่น และเตรียมสารละลายอินดิเคเตอร์เข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 M ที่มีค่าพีเอช 7.5 ทำการกวนผสมส่วนผสมของฟิล์มและสารละลายอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกระทั่งส่วนผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแก๊สหรือฟองอากาศ แล้วนำส่วนผสมของฟิล์มเมทิลเซลลูโลสที่เตรียมไว้ มาขึ้นรูปเป็นแผ่นบนกระจกซึ่งหุ้มด้วย nylon/LLDPE ขนาด 50 ไมครอน ขนาด 15x21 เซนติเมตร ซึ่งมีพื้นที่ 315 ตารางเซนติเมตร จากนั้นทำให้ฟิล์มแห้ง โดยวางฟิล์มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3.2 การผลิตแถบซีวัดเอทานอลโดยใช้แผ่นดูดซับ

แผ่นดูดซับทำจากกระดาษเซลลูโลสขนาด 2x2 เซนติเมตร การเตรียมแถบซีวัดเอทานอลจากแผ่นดูดซับ ทำโดยการแช่กระดาษเซลลูโลสในสารละลายเอ็นไซม์ที่เตรียมในตอน 3.2.1-3.2.2 โดยแช่เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นวางแถบซีวัดไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้มีความชื้นประมาณไม่เกินร้อยละ 30 แล้วเก็บไว้ในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป ในเวลาไม่เกิน 1 เดือน

เมื่อได้แถบซีวัดเอทานอลในข้อ 3.1 และ 3.2 แล้ว ทำการเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ที่มีความเข้มข้น 2 ระดับ คือ สารละลายเอ็นไซม์ความเข้มข้นสูง และสารละลายเอ็นไซม์ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสารละลายเอ็นไซม์ความเข้มข้นสูง ใช้เอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.3 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.04 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ DCIP เข้มข้น 2 M ส่วนการเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ความเข้มข้นต่ำ ใช้เอ็นไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.15 เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเข้มข้น

ร้อยละ 0.02 และ DCIP เข้มข้น 2 M โดยทำการเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ ในสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 M ที่มีค่าพีเอช 7.5 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

3.3 การศึกษาสมบัติของฟิล์มเมทิลเซลลูโลสและแผ่นดูดซับ

3.3.1 สมบัติของฟิล์มเมทิลเซลลูโลส

- ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มเมทิลเซลลูโลสด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ช่วง 600 ถึง 4000 cm^{-1}
- ทำการวัดสมบัติเชิงกล และการซึมผ่านออกซิเจนและไอน้ำ
- ทำการวิเคราะห์อุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (T_g) ของเมทิลเซลลูโลสด้วยเทคนิค dynamic mechanical analysis (DMA)
- ทำการวิเคราะห์อุณหภูมิที่ฟิล์มเมทิลเซลลูโลสเปลี่ยนสถานะ หรือความเสถียรเชิงความร้อน โดยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) และวิธี Thermogravimetric Analysis (TGA)

3.3.2 สมบัติของแผ่นดูดซับ

- ทำการวิเคราะห์ค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี Color Quest II Sphere
- วัดความหนาโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์
- วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่องอบลมร้อน

4) การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของแถบซีวีดีเอทานอล

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแถบตัวซีวีดีเอทานอล โดยการนำแถบซีวีดีเอทานอลที่ผลิตได้ในข้อ 3 ไปทดสอบกับมะม่วงในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของแถบซีวีดี เทียบกับลักษณะปรากฏของมะม่วงในระหว่างการเก็บรักษา

5) การศึกษาประสิทธิภาพของแถบซีวีดีเอทานอล ในการตรวจติดตามคุณภาพมะม่วง โดยการวัดสี ปริมาณกรด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และการสังเกตลักษณะปรากฏของมะม่วงที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศ

ทำการศึกษาโดยนำแถบตัวซีวีดีเอทานอลที่มีความเหมาะสมที่ได้จากตอนที่ 4 ไปทำการทดสอบกับมะม่วงที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ดัดแปลงบรรยากาศ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำถุงมะม่วงมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ดังนี้

5.1 การเปลี่ยนแปลงสีของแถบชี้วัดเอทานอล

การเปลี่ยนแปลงสีของแถบชี้วัด ทำโดยสังเกตการเปลี่ยนสี และใช้เครื่องวัดสี Color Quest II Sphere

5.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และลักษณะปรากฏของมะม่วงน้ำดอกไม้

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะม่วง ทำโดยการวัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity as citric acid) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) โดยใช้เครื่อง Hand Refractometer และทำการสังเกตลักษณะภายนอก