บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมผลผลิต

ในการทดลองนี้ใช้มะเขือเทศเชอรี่ที่ปลูกแบบอินทรีย์และแบบเคมี สายพันธุ์ทับทิมแดง จากจังหวัดนครราชสีมา ขนส่งโดยรถห้องเย็นมายังกรุงเทพฯ และขนย้ายผลผลิตมายังห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พื้นที่การศึกษาเขตบางขุนเทียน ทำการคัดเลือกมะเขือเทศผลสุกแก่ในระยะ Breaker (สุกมีสีส้มประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์) ที่มีขนาดสม่ำเสมอ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้ง เพื่อใช้ในชุดการทดลองต่างๆ ดังนี้

3.2 การวางแผนการทดลอง

3.2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ-ชีวเคมีของมะเขือเทศเชอรี่ปลูกแบบอินทรีย์และแบบเคมี

นำมะเขือเทศเชอรี่ที่ปลูกแบบอินทรีย์ และแบบเคมีระยะสุกมีสีส้มประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา แล้วบรรจุลงในกล่องพลาสติก Polyethylene terephthalate (PET) ชนิด clamshell เจาะรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรจำนวน 2 รู กล่องขนาด 3×4×2.5 นิ้ว กล่องละ 200 กรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±5 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ทุกๆ 4 วัน เป็นเวลา 20 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ในแต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด
2. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก
3. ความแน่นเนื้อ
4. อัตราการหายใจ

p5. การผลิตเอทิลีน

6. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เช่น DPPH และ FRAP assay

7. สารประกอบฟีนอลลิก (Total phenolic content)

8. ปริมาณไลโคปีน (Lycopene)

9. ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoinds)

10. ปริมาณปริมาณ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid contents

11. กิจกรรมเอนไซม์ SOD, CAT และ APX

3.2.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษามะเขือเทศเชอรี่ที่ปลูกแบบอินทรีย์

ทำการเตรียมมะเขือเทศอินทรีย์เชอรี่อินทรีย์ที่ระยะสุกแก่ breaker ตามข้อ 3.1 เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมีนาคม 2556 และบรรจุในถุงชนิดต่าง ๆ ขนาด 6×9 นิ้ว จำนวน 150 กรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±5 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่บรรจุถุง)

ชุดการทดลองที่ 2 บรรจุถุงพลาสติกที่ผสมสารดูดซับเอทิลีน (active ethylene removing, AER)

ชุดการทดลองที่ 3 บรรจุถุงพลาสติกโพลีโพพิลีนเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 8 รู (PPP)

ชุดการทดลองที่ 4 บรรจุถุงพลาสติกโพลีโพพิลีนที่มีช่องฟิล์ม active ethylene removing ขนาด 5×5 เซนติเมตร (ถุง PP ที่มี ethylene removing window, ERW)

ตารางที่ 3.1 อัตราการการซึมผ่านของก๊าซของถุง active ethylene removing และถุง PP ที่มี ethylene removing window ขนาด 5×5 เซนติเมตร

ถุง	O_2 TR cc/m^2day	CO_2 TR cc/m^2day	C_2H_4 TR cc/m^2day
PP with ethylene removing window	2,135±137	7,342±231	4,608±812
Ethylene removing	10,554±95	36,350±1,342	43,082±3,513

ที่มา:(ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2553)

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด
2. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก
3. ความแน่นเนื้อ
4. ก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะบรรจุ
5. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เช่น DPPH และ FRAP assay
6. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS)
7. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity, TA)
8. ปริมาณ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid contents
9. ปริมาณไลโคปีน (Lycopene)
11. ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoinds)
12. อายุการเก็บรักษา

3.2.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการฉายรังสี UV-B ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะเขือเทศเชอรี่ปลูกแบบอินทรีย์ในระหว่างการวางจำหน่าย

ทำการเก็บเกี่ยวมะเขือเทศเชอรี่ปลูกแบบอินทรีย์ที่ระยะสุกแก่ breaker เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมิถุนายน 2556 นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปฉายรังสี UV-B ที่ระดับ 0 (control), 5, 15 และ 30 kJ.m^{-2} ก่อนนำไปบรรจุถุง (active ethylene removing, AER) จำนวน 150 กรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ ทุก 5 วัน เป็นเวลา 30 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD)

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด
2. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก
3. ความแน่นเนื้อ
4. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) เช่น DPPH และ FRAP assay
5. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solids ; TSS)

6. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity)

7. ปริมาณ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid contents

8. ปริมาณไลโคปีน (Lycopene)

9. ปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoinds)

3.3 การบันทึกผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด

การวัดการสูญเสียน้ำหนักสด ทำโดยชั่งน้ำหนักสดในแต่ละชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แล้วคิดเป็นร้อยละของการสูญเสียน้ำหนัก โดยคำนวณการสูญเสียน้ำหนักสดจากสมการ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนักสด (ร้อยละ)} = \frac{\text{(น้ำหนักเริ่มต้น-น้ำหนักหลังการเก็บรักษา)}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

2. สีผิวมะเขือเทศ

ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงสีผิวผลมะเขือเทศด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chroma Meter (Model CR-100, Tokyo, Japan) โดยให้ผลสัมผัสกับหัววัดมากที่สุด ทำการวัดสี 3 ครั้ง ต่อ ผล โดยวัดบริเวณกลางผล และใช้ระบบการวัดสีแบบ Three-dimension color space ซึ่งรายงานผลเป็นค่า Hunter Scale (McGuire, 1992; Voss, 1992) ประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

- L* เป็นค่าความสว่างของสี ซึ่งค่า L* มีค่า 0 ถึง 100

ถ้าค่า L* สูง หมายถึง มีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L* ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมาก

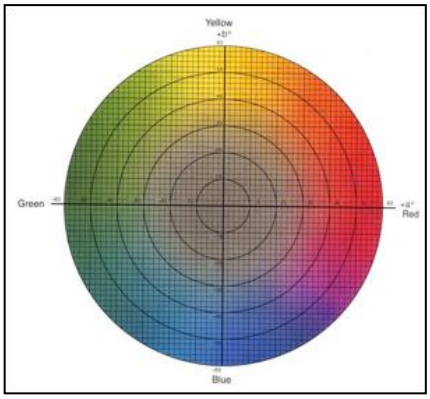
- a* เป็นค่าการแสดงออกของสีในช่วงสีเขียวไปจนถึงสีแดง

เมื่อค่า a* เป็นลบจะอยู่ในช่วงสีเขียว ถ้าค่า a* เป็นบวกจะอยู่ในช่วงสีแดง

- b* เป็นค่าการแสดงออกของสีในช่วงสีน้ำเงินไปจนถึงสีเหลือง

เมื่อค่า b* เป็นลบจะอยู่ในช่วงสีน้ำเงิน ถ้าค่า b* เป็นบวกจะอยู่ในช่วงสีเหลือง

- Hue หรือ Hue angle สามารถคำนวณได้จากมุมระหว่างด้านตรงข้ามกับมุมฉาก และ 0° บนแกนของ a (เขียวน้ำเงิน/ม่วงแดง) และ ° Hue จะเป็นคำนวณอยู่ในระหว่าง 0° 360° ของวงสี



รูปที่ 3.1 ไดอะแกรมสัมประสิทธิ์ค่าสี a*และ b* (McGuire, 1992; Voss, 1992)

3. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging method (Brand-Williams, et al. 1995; Sokmen, et al. 2004)

<u>สารเคมี</u>

เตรียม 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH)โดยชั่ง DPPH ปริมาณ 24 mg ละลายใน methanol 95% ปริมาตร 100 mL เป็น stock solution ก่อนใช้นำ stock solution 10 mL เติมเมทานอล 95% ปริมาณ 45 mL

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

ชั่งมะเขือเทศเชอรี่ 3 g เติมเมทานอลความเข้มข้น 80 % ปริมาตร 20 mL ปั่นให้ละเอียดนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 º C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 º C นาน 20 นาที นำส่วนใสมา 150 µL ผสมกับสาร DPPH ปริมาณ 2,850 µL เขย่าให้เข้ากันเก็บในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm หาร้อยละการยับยั้งจาก $(1-(A_{Sample}/A_{Blank}))\times100$ แล้วจึงคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 50 ถึง 800 µL รายงานผลเป็น mM TE/gFW

<u>คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง</u>

$$\%\ DPPH_{\text{การยับยั้ง}} = \frac{(DPPH_{(initial)} - DPPH_{(sample)}) \times 100}{DPPH_{(initial)}}$$

4. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (Benzie และ Strain, 1996)

ในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyl triazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมของเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} -TPTZ โดยใช้ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน

<u>สารเคมี</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1.0 mM โดยการชั่งสาร Trolox จำนวน 6.25 mg ละลายใน ethanol 80% ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL และปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL จากนั้นนำสาร Trolox มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 300 และ 500 µM ตามลำดับ

<u>การเตรียมสารละลายทดสอบกับตัวอย่าง (สารละลาย FRAP)</u>

นำสารละลาย Sodium acetate ความเข้มข้น 300 mM pH 3.6 ปริมาตร 25 mL ผสมกับสาร 10 mM TPTZ ปริมาตร 5 mL และ 20 mM $FeCl_3$ ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

ชั่งมะเขือเทศเชอรี่ 3 g เติมเอทานอลความเข้มข้น 80 % ปริมาณ 20 mL ปั่นให้ละเอียดนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ° C นาน 20 นาที นำสารสกัดส่วนใสจากมะเขือเทศเชอรี่ ปริมาตร 150 µL และเติมสารละลาย FRAP ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด 30 นาที นำ สารละลายตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu, Japan รุ่น UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 593 nm จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox

5. อัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

นำผลมะเขือเทศเชอรี่ชั่งน้ำหนักประมาณ 80±5 g และเก็บในกล่องพลาสติก ที่มีปริมาตร 354 mL แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างก๊าซภายในกล่องด้วยกระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 mL ดูดอากาศจากช่องว่างด้านบนของภาชนะนำไปวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เครื่อง Gas chromatography (GC) ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-8A รายงานผลเป็นร้อยละของความเข้มข้นก๊าซ ส่วนการวิเคราะห์เอทิลีน ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC 14B (Shimadzu, Japan) ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3.1 นำค่าที่ได้จากเครื่องมาคำนวณการหายใจ (mg CO_2 /kg.hr.) และการผลิตเอทิลีน (μL/kg.hr)

ตารางที่ 3.2 สภาวะการวิเคราะห์วัดคาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลีนของเครื่อง Gas Chromatography

	CO_2	C_2H_4
GC Column type	Porapack Q (Mesh 80/100)	Porapack Q (Mesh 80/100)
Column temperature	120°C	120°C
Inject temperature	50°C	80°C
Detector	TCD	FID
Carrier gas	He	N_2

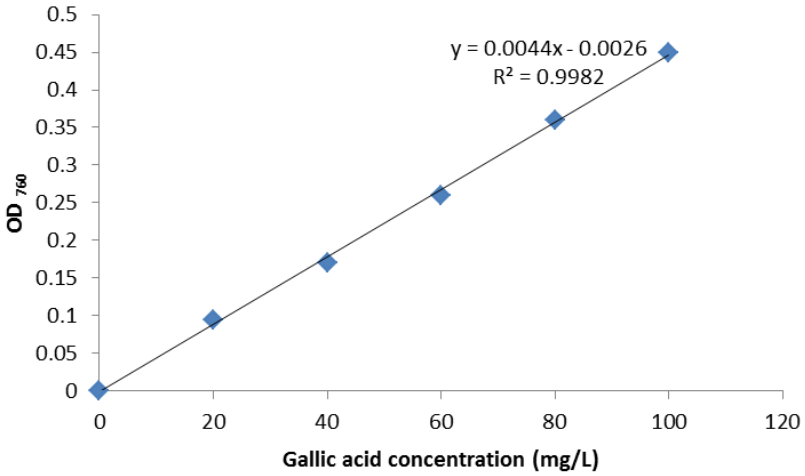
6. ความแน่นเนื้อ

โดยวัดค่าความแน่นเนื้อมะเขือเทศบริเวณกลางผล ด้วยเครื่อง Texture analyzer รุ่น TA-XT2 ติดตั้งด้วย probe ชนิดหัวเจาะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ขณะทำการวัดระยะทางที่ probe กดเข้าไปในผลมะเขือเทศ เท่ากับ 5 mm ความเร็วในการกด เท่ากับ 1 mm/min รายงานผลในหน่วยนิวตัน (N)

7. ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของมะเขือเทศเชอรี่ (Singleton, 1965)

นำตัวอย่างมะเขือเทศเชอรี่ผสมกับสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปั่นให้ละเอียดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 rpm นาน 20 นาที นำส่วนใส มาวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอล โดยทำให้เจือจางลง 100 เท่า แล้วปิเปตสารตัวอย่างที่ทำการเจือจางนี้มา 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย folin ciocalteu (สารละลาย folin-ciocalteu ความเข้มข้น 2 N เจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 5 mL ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

(ละลายโซเดียมคาร์บอเนตจำนวน 75 g ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ 1,000 mL) ปริมาตร 4 mL จากนั้นนำไปวางไว้ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้ายไปแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 mg/L (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

8. การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ และ ไลโคปีน (Lee, 2001; Fish et al., 2002)

ชั่งมะเขือเทศเชอรี่ จำนวน 0.5 g เติม solution mixture 39 mL (hexane:ethanol:acetone (2:1:1 ต่อปริมาตร) โดยมี 0.05% butylated hydroxytoluene (BHT) บดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer ในที่มืด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ 10 mL มาเติมน้ำ 10 mL แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการดูดสารละลายส่วนบนนำไปวัดปริมาณคาโรทีนอยด์และไลโคปีน ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 และ 503 nm ตามลำดับ นำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณตามสมการที่ 1 และ 2 รายงานปริมาณคาโรทีนอยด์เป็น (mg β-CaE/kg fw) ε =1.25×10^4 µg/L และปริมาณไลโคปีนเป็น (mg/kg fw) ค่า $\varepsilon = 17.2\times10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$

แคโรทีนอยด์ $= OD\times(1.25\times10^4)\times(0.5/39.5)$ .....(1)

ไลโคปีน $= OD\times(39.5/0.5)\times(17.2\times10^4)$ .....(2)

9. ปริมาณวิตามินซี (Kampfenkel et al. 1995)

นำตัวอย่างเนื้อมะเขือเทศเชอรี่มา 5 g เติมสาร meta phosphoric acid ปริมาตร 20 mL ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำตัวอย่าง ปริมาตร 0.4 mL และเติมสาร indophenol ปริมาตร 0.2 mL เติม thiourea ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 0.4 mL และ DNP ความเข้มข้น 0.2 % ปริมาตร 0.2 mL (blank ไม่ต้องเติม DNP แต่ให้เติมภายหลังการบ่ม) เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม sulfuric acid ความเข้มข้น 85% ปริมาตร 1 mL ส่วนหลอด blank ให้เติม DNP ปริมาตร 0.2 mL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 540 nm โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้ meta-phosphoric acid ความเข้มข้น 5% แทนสารตัวอย่าง รายงานผลการทดลองในหน่วยของ mg/kg FW โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ascorbic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

1) Meta-phosphoric acid ความเข้มข้น 5 %

ชั่งสาร Meta-phosphoric acid จำนวน 5 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

2) Indophenol ความเข้มข้น 0.02 %

ชั่งสาร 2,6-Dichloroindophenol sodium salt จำนวน 20 mg ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

3) Thiourea ความเข้มข้น 0.2 %

ชั่งสาร Thiourea จำนวน 2 g ละลายใน Meta-phosphoric acid ความเข้มข้น 5 % ปริมาตร 100 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

4) 2,4-Dinitrophenyl-hydrazine (DNP) ความเข้มข้น 0.2 %

ชั่งสาร DNP จำนวน 2 g ละลายในกรด sulfuric acid ความเข้มข้น 10 N (น้ำ: sulfuric acid อัตราส่วน 1 ต่อ 3) ปริมาตร 100 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C (เก็บได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์)

5) สารละลาย Ascorbic acid

ชั่งสาร Ascorbic acid จำนวน 10 mg ละลายในสารละลาย Meta-phosphoric acid ความเข้มข้น 5 % จำนวน 100 mL จะได้สารละลายความเข้มข้น 100 µg/mL นำมาเจือจางด้วยสารละลาย Meta-phosphoric

acid ความเข้มข้น 5 % เพื่อเตรียมสารละลาย Ascorbic acid ความเข้มข้น 5 10 20 30 40 และ 50 µg/mL สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

10. กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (Constantine and Stanley, 1952)

การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง (Crude enzyme)

โดยชั่งตัวอย่าง 5 g เติม Sodium Phosphate buffer 10 mL (ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.8 ประกอบด้วย 1% polyvinyl polypyrrolidone (PVP) และ 0.025% Triton X-100) หลังจากนั้นทำการปั่นตัวอย่างด้วยเครื่อง homogenizer ขณะปั่นหลอดตัวอย่างต้องเย็น แล้วนำไป Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 20 นาที จะได้ส่วนใสหรือสารสกัด (Crude enzyme) เพื่อนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ SOD

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ SOD

ดูดส่วนใสที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 3 mL ผสมเข้ากับ สาร Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M, pH 7.8 และ 0.025% Triton X-100 ปริมาตร 2.31 mL เติม L-methionine ความเข้มข้น 0.13 M ปริมาตร 0.3 mL เติม nitro blue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 0.63 mM ปริมาตร 0.3 mL และเติม riboflavin ความเข้มข้น 0.15mM ปริมาตร 0.04 mL แล้วเติม สารสกัด 0.05 mLทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 nm หลังจากนั้นนำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (Unit/mg protein) โดยกำหนดให้ 1 Unit คือกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ที่ทำให้ NBT ลดลง 50 % ที่ความยาวคลื่น 560 nm ที่อุณหภูมิ 25 °C

11. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง (Crude enzyme) สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ CAT และ APX (Nakano and Asada, 1981)

โดยชั่งตัวอย่างมะเขือเทศ 5 g เติม phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.0 ปริมาตร 10 mL มีส่วนผสมของสาร EDTA ความเข้มข้น 1.0 mM และ ความเข้มข้น 1 % polyvinyl polypyrrolidone (PVP) หลังจากนั้นทำการปั่นตัวอย่างด้วยเครื่อง homogenizer แล้วนำไป Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ด้วยความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 20 นาที จะได้ส่วนใสหรือสารสกัด (Crude enzyme) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ CAT และ APX

12. กิจกรรมเอนไซม์ Catalase (CAT) (วิธีการวัดกิจกรรมดัดแปลงจาก Beers and Sizer, 1952)

ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ เท่ากับ 1.05 mL ซึ่งประกอบด้วย ส่วนใสที่ได้จากการสกัด 150 µL สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 50 mM (pH 7.0) ปริมาตร 800 µL เติมสารละลาย Hydrogen peroxide ความเข้มข้น 15 mM ปริมาตร 100 µL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 240 nm ทันที ซึ่งวัดแบบ kinetic โดยใช้ระยะเวลาทั้งหมด 20 วินาที และ lag/rate เท่ากับ 0 วินาที / 20 วินาที หลังจากนั้นนำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (Unit/mg protein) โดยกำหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.01 ที่ความยาวคลื่น 240 nm/min ที่อุณหภูมิ 25 °C

13. กิจกรรมเอนไซม์ Ascorbate peroxidase (APX) (ดัดแปลงจาก Nakano and Asada, 1981)

ปริมาตรสารทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา เท่ากับ 2.6 mL ประกอบด้วย 50 mM phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2.3 mL, 0.5 mM ascorbate จำนวน 114µL, H_2O_2 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 114 µL และเอนไซม์สกัดปริมาตร 114 µL แล้วนำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ทันที ซึ่งวัดแบบ kinetic โดยใช้ระยะเวลาทั้งหมด 120 วินาที และ lag/rate เท่ากับ 15 วินาที / 120 วินาที หลังจากนั้นนำค่าที่อ่านได้ไปคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนมาตรฐาน (Unit/mg protein) โดยกำหนดให้ 1 Unit ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.01 ที่ความยาวคลื่น 290 nm/min ที่อุณหภูมิ 25 °C

14. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การเตรียมสารละลาย Coomassie brilliant blue

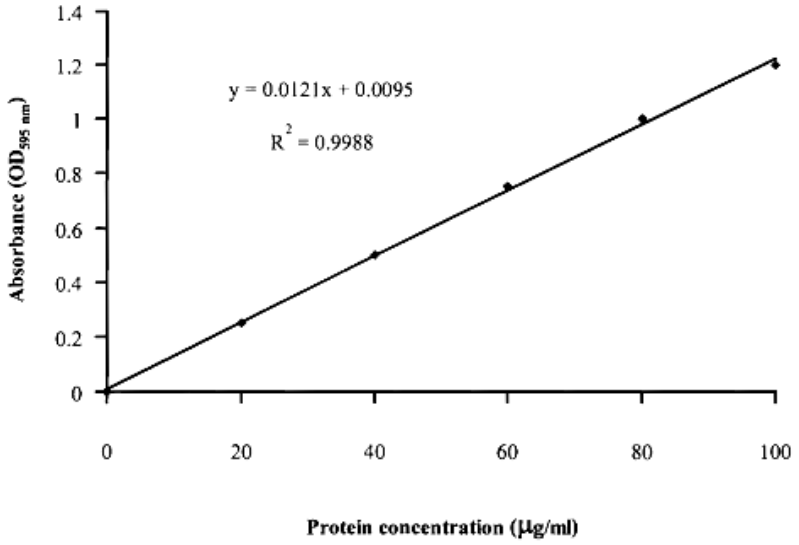
โดยนำสาร Coomassie blue 100 mg มาละลายในเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 50 mL จนกระทั่งละลายหมด แล้วเติมสาร phosphoric acid ความเข้มข้น 85 % จำนวน 100 mL ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 mL ด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ 1 mL ผสมกับสารละลาย Coomassie blue 4 mL เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin) และรายงานผลใน หน่วย mg/mL

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Co., Ltd) จำนวน 2.5 mg ละลายในสารละลาย Phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 25 mL ได้เป็นสารละลายโปรตีน ความเข้มข้น 100 µg/ mL แล้วนำมาสารละลายโปรตีนที่ได้มาเจือจางด้วย Phosphate buffer pH 7.0 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm และนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.3.)



รูปที่ 3.3 ปริมาณโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 nm

15. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

นำน้ำคั้นมะเขือเทศเชอรี่มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้หรือ Total soluble solids โดยใช้ Hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น N1 ค่าที่ได้อ่านได้เป็น องศาบริกซ์ (^{o}Brix)

16. ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้

น้ำคั้นมะเขือเทศ 1 mL ผสมน้ำกลั่น 9 mL นำมาไตเตรตกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล โดยใช้ Phenolphthaline ความเข้มข้น 1 % ปริมาณ 1-2 หยด เป็น indicator จนถึงจุดยุติ (เมื่อสารละลายมีสีชมพูอ่อนอย่างน้อย 30 วินาที) แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ในรูปของกรดซิตริก ตามสมการดังนี้

$$\text{TA (\%citric acid)} = \frac{\text{(ml NaOH) (N NaOH) (meq.wt.citric acid)} \times 100}{\text{Wt of sample}}$$

meq.wt.citric acid = 0.064