บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุพันธุ์พืช

ผักกาดหวานพันธุ์ Tibureus (*Lactuca sativa* var. longefolla) ที่เก็บเกี่ยวจากแปลงเกษตรกรในเขตพื้นที่ปลูกของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ซึ่งมีความแก่ทางการค้าขนส่งมายังศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เพื่อลดอุณหภูมิแบบสุญญากาศ จากนั้นนำผักกาดหวานส่งมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทำการทดลองทันทีหลังจากขนส่งผลิตผลมาถึงห้องปฏิบัติการ

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องลดอุณหภูมิผัก Hydro vacuum cooling ของบริษัท Hussmann ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 เครื่องวัดความชื้น Data logger ของบริษัท Testo รุ่น 175-H2 Vol.10 ประเทศเยอรมัน

3.2.3 เครื่องวัดอุณหภูมิภายในผักและผลไม้ (Digital Thermometer) รุ่น PDT 550 ของบริษัท Tequipment.NET ประเทศสหรัฐอเมริกา วัดอุณหภูมิได้ -50 ถึง 300 องศาเซลเซียส

3.2.4 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital Refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท Atago ประเทศญี่ปุ่น อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์.

3.2.5 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA 3100P ของบริษัท Satorius *Basic* ประเทศเยอรมัน ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200 ของบริษัท AND ประเทศญี่ปุ่น ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

3.2.6 เครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ (Coffee Blender) ของบริษัท Princess รุ่น 2194 ประเทศ Republic of China (Taiwan)

3.2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Digital Spectrophotometer) รุ่น Spectro 23 ของบริษัท LaboMed ประเทศสหรัฐอเมริกา และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Spectrometer) รุ่น GENESYS 10 UV ของบริษัท CE ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.8 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน รุ่น SP-18420-26 ของบริษัท Nuova II ประเทศสหรัฐอเมริกา

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2.9 Micropipette ของบริษัท Rainin Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.10 กระดาษกรอง Whatman No.1 ของบริษัท Whatman International ประเทศอังกฤษ

•3.2.11 เครื่องวัดสี (Chroma meter) ตัวเครื่องรุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น หัววัด CR-310 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L*, chroma, hue angle (h°) โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ (ภาพที่ 3.1)

L*=The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- มีค่าความสว่างมากเมื่อมีค่าใกล้ 100
- มีค่าความมืดมากเมื่อมีค่าใกล้ 0

a* , b* = The chromaticity coordinates (Hue angle, chroma)

ค่า a*

- มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง
- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b*

- มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง
- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma เป็นค่าที่แสดงให้เห็นถึงความอิ่มตัวของสี (McGuire, 1992)

- มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง
- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

การคำนวณหาค่า Chroma และ Hue angle จากสมการ ดังนี้

Chroma = $(a^{*2}+b^{*2})^{½}$

Hue angle = arctangent(b*/a*) เมื่อ a*>0 และ b*$\geq$0

= arctangent(b*/a*)+180° เมื่อ a*<0

= arctangent(b*/a*)+360° เมื่อ a*>0 และ b*<0

ค่า Hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงถึงมุมในการตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา (McGuire, 1992)

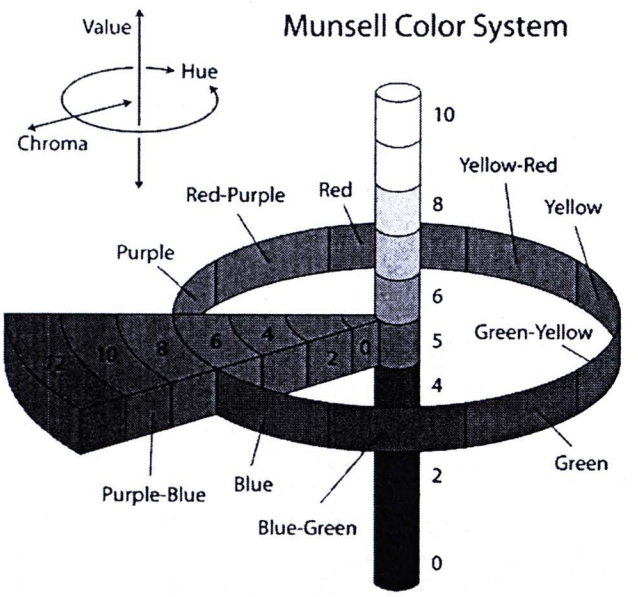
ค่า Hue angle เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง 180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน

45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง 225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน

90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว 270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว 315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง



ภาพ 3.1 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็นค่า L*, chroma และ hue angle

3.2.12 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รุ่น LC 203LD ของบริษัท ฟรีเซอร์ (ไทยแลนด์) ประเทศไทย

3.2.13 เครื่องเขย่าสาร

3.2.14 กล้องถ่ายรูป รุ่น Cyber-shot ของบริษัท SONY ประเทศญี่ปุ่น

3.2.15 นาฬิกาจับเวลาของบริษัท CASIO

3.2.16 ลูกยางดูดอากาศ

3.2.17 กล่องครอบปฏิกิริยาในที่มืด

3.2.18 ชั้นวางหลอดทดลอง

3.2.19 Nylon syringe filter

3.2.20 ตะกร้าพลาสติก

3.2.21 มีด

3.2.22 เขียงพลาสติก

3.2.23 ผ้าขาวบาง

3.2.24 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์ (Beaker)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- บิวเรต (Burette)
- ปีเปต (Pipette)
- กรวยกรอง
- ช้อนตักสารเคมี
- หลอดทดลอง

3.2.25 ตู้ UV

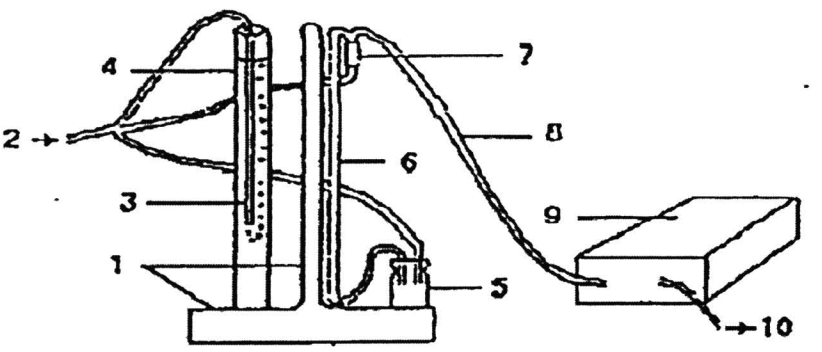
3.2.26 Oven

3.2.27 เครื่อง Gas chromatography รุ่น GC-8A ของบริษัท SHIMASZU Corporation ประเทศญี่ปุ่น โดยมีรายละเอียดดังนี้

- Detector : Thermal conductivity detector (TCD)
- Column : Molecular Sieve 5A 80/100 ท่อสแตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 2 เมตร อุณหภูมิสูงสุด 350 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์แก๊สออกซิเจน และ Porapak Type N80/100 ท่อสแตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 1 เมตร อุณหภูมิสูงสุด 190 องศาเซลเซียส สำหรับการวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- Injection temperature : 110 องศาเซลเซียส
- Column temperature : 70 องศาเซลเซียส
- Oven temperature : 110 องศาเซลเซียส
- Carrier gas : แก๊สฮีเลียม (helium gas) มีอัตราการไหล 25 มิลลิลิตร/นาที
- Standard gas : ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ ในก๊าซไนโตรเจน

3.2.28 ชุดแผงควบคุมการไหลของอากาศ (flow board) สำหรับวัดอัตราการหายใจ (ภาพที่ 3.2) ประกอบด้วย

1. แผงและฐานไม้
2. ทางอากาศเข้า
3. หลอดแก้วระบายอากาศ
4. หลอดแก้วใหญ่บรรจุน้ำเต็ม
5. ขวดแก้วบรรจุน้ำ
6. หลอดแก้วแสดงระดับความดัน
7. หลอดรูเล็ก (capillary tube)
8. หลอดนำก๊าซ
9. ภาชนะบรรจุผลิตผล
10. ทางออกอากาศ

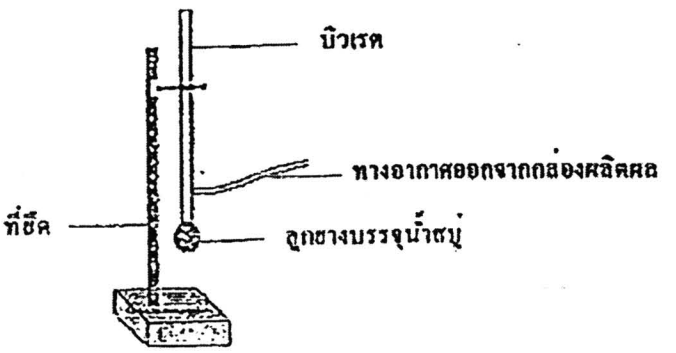


ภาพ 3.2 ชุดแผงควบคุมการไหลของอากาศ

หลักการทำงานของแผงชุดควบคุมการไหลของอากาศ คือ เมื่อให้อากาศจากเครื่องสูบลมผ่านเข้าช่องอากาศเข้า (2) อากาศจะแยกเป็น 3 ทาง คือ ผ่านเข้าสู่น้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) หรือ ผ่านเข้าไปในขวดบรรจุแก้วน้ำ (5) หรือออกไปทางหลอดรูเล็ก (capillary tube) (7) แล้วออกสู่ภาชนะบรรจุผลิตผล (9) กรณีที่อากาศผ่านเข้ามามีแรงดันต่ำอากาศส่วนใหญ่จะไหลไปทางหลอดรูเล็ก (capillary tube) เพราะไม่สามารถดันน้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) หรือในขวดแก้ว (5) ได้ แต่เมื่อเพิ่มความดันของอากาศที่ผ่านเข้ามาให้มากขึ้น อากาศจะดันน้ำในหลอดแก้วระบายอากาศ (3) ให้ต่ำลง และดันน้ำในขวดแก้ว (5) ขึ้นไปตามหลอดแก้วแสดงระดับความดัน (6) ซึ่งจะสูงเท่ากับระดับความดันของอากาศที่ผ่านเข้ามาในขณะนั้น ถ้าความดันอากาศเพิ่มขึ้นจะดันน้ำในหลอดแก้ว (3) ให้ต่ำลงจนเห็นเป็นฟองอากาศออกไปที่ปลายหลอดแก้วระบายอากาศ (3)

3.2.29 ชุดวัดอัตราการไหลของอากาศ (air flow meter) (ภาพที่ 3.3) ประกอบด้วย

- ทางอากาศเข้า
- บิวเรตต์ (burette)
- ลูกยางบรรจุน้ำสบู่



ภาพ 3.3 ชุดวัดอัตราการไหลของอากาศ

หลักการทำงานของเครื่อง คือ เมื่อต่อสายยางที่มีอากาศผ่านจากหลอดรูเล็ก (capillary tube) ในชุดแผงควบคุมอัตราการไหลของอากาศเข้ากับชุดวัดอัตราการไหลของอากาศแล้ว เมื่อบีบลูกยางให้น้ำสบู่ไหลขึ้นไปปิดทางอากาศออก ขณะที่อากาศไหลออกจากหลอดรูเล็ก (capillary tube) เข้าสู่บิวเรตต์ อากาศจะดันน้ำสบู่ให้เป็นฟองไหลออกไปตามบิวเรตต์ วัดอัตราการไหลของอากาศโดยจับเวลาการเคลื่อนที่ของฟองสบู่ แล้วคำนวณเป็นอัตราการไหลของอากาศมีหน่วยเป็นมิลลิลิตรต่อนาที

3.3 สารเคมีและวิธีเตรียมสารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid, UNIVAR) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 2, 6–ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2, 6-dichlorophenol indophenols, SIGMA) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วย 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล จนถึงจุดยุติ จดบันทึกปริมาตร 2, 6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

3.3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

- อะซิโตน (acetone, Merck) ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยตวงอะซิโตนความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3.3.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

- สารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka) เตรียมโดยชั่ง 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 74 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล ความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol) แล้วปรับปริมาณด้วยเอทานอลเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ให้ครบ 200 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วย nylon syringe filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแกลลิก (gallic acid, Fluka) เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก 24.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลซียส

3.3.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

- โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Merck) ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- Folin-Ciocalteau's phenol reagent, Merck.

3.3.5 สารเคมีที่ใช้หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

- สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้สารละลายเจือจาง ตัวอย่างเตรียมโดยชั่งเปปโตน (peptone, Becton and Dickinson Company) มา 1 กรัม ซึ่งมีสารประกอบของเกลือแกง (sodium chloride, Becton and Dickinson Company) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งเกลือแกงมา 5 กรัม เติมลงในสารละลายเปปโตนผสมให้ละลายเข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดแก้วทนความร้อนแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อมา 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่ในขวดแก้วทนความร้อน แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

นาน 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ซึ่งในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่เตรียมได้ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ต่อสารละลาย 1 ลิตร ดังนี้

Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ศูนย์ผลิตผลโครงการหลวง ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดสองที่ 1 การหาพารามิเตอร์ที่เหมาะสมในการลดอุณหภูมิผักกาดหวานโดยใช้ระบบสุญญากาศ

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เก็บรักษาไว้ที่ห้องเย็นปรกติโดยไม่ลดอุณหภูมิระบบสุญญากาศ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ลดอุณหภูมิโดยกำหนดให้ความดันสุดท้ายที่ 5.5 มิลลิบาร์

กรรมวิธีที่ 3 ลดอุณหภูมิโดยกำหนดให้ความดันสุดท้ายที่ 6.0 มิลลิบาร์

กรรมวิธีที่ 4 ลดอุณหภูมิโดยกำหนดให้ความดันสุดท้ายที่ 6.5 มิลลิบาร์

กำหนดอุณหภูมิสุดท้ายของผักกาดหวานให้อยู่ที่ประมาณ 4±2 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

คัดเลือกผักกาดหวานพันธุ์ Tibureus ที่ได้จากการปลูกในพื้นที่ของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ที่มี ขนาด ลักษณะ อายุการเก็บเกี่ยว และปลูกในพื้นที่เดียวกัน ตัดแต่งแล้วบรรจุลงในถุงโพลิเอทิลีนขนาดกว้าง 25.40 เซนติเมตร ยาว 40.64 เซนติเมตร ที่เจาะรู 18 รู แล้วนำไปจัดเรียงในตะกร้าพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน ขนาดกว้าง 35.56 เซนติเมตร ยาว 55.88 เซนติเมตร สูง 29.21 เซนติเมตร โดยมีปริมาณการบรรจุ 5 กิโลกรัมต่อ 1 ตะกร้า จากนั้นนำตะกร้าไปจัดเรียงในเครื่องลดอุณหภูมิด้วยระบบสุญญากาศ ตั้งค่าพารามิเตอร์สำหรับการทำงานของเครื่องลดอุณหภูมิด้วยระบบสุญญากาศ ได้แก่ ค่าความดันสุดท้ายภายในห้องลดอุณหภูมิเท่ากับ 5.5, 6.0 และ 6.5 มิลลิบาร์ และเวลาที่วางผักไว้ในห้องลดอุณหภูมิ เท่ากับ 15, 20 และ 25 นาที จนกว่าจะได้พารามิเตอร์ที่ทำให้ผักกาดหวานมีอุณหภูมิสุดท้ายที่กำหนดและใช้เวลาในการลดอุณหภูมิน้อยที่สุดซึ่งดูจากอุณหภูมิใจกลางผักกาดหวานให้อยู่ที่ 4±2 องศาเซลเซียส ไม่มีการเหี่ยวที่ปลายใบของผักกาดหวานหลังการลดอุณหภูมิและใช้ระยะเวลาที่ผลิตผลอยู่ภายใต้ความดันที่กำหนดน้อยที่สุด

บันทึกผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างกระบวนการทุกๆ 1 นาทีจนสิ้นสุดกระบวนการ
2. ความสัมพันธ์ระหว่างความดัน อุณหภูมิและเวลา
3. ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในห้องลดอุณหภูมิจนสิ้นสุดกระบวนการ
4. พลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการลดอุณหภูมิ

การทดลองที่ 2 คุณภาพของผักกาดหวานที่ผ่านการลดอุณหภูมิแล้ว

จากผลการทดลองที่ 1 นำผักกาดหวานที่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศโดยใช้พารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์ค่า Mean มี 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหวานที่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศ

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหวานที่ไม่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศ (control)

แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำใช้ผักกาดหวานซ้ำละ 2 หัว บันทึกการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีทั้งหมดทุกวันจนผลิตผลหมดอายุการเก็บรักษา ซึ่งอายุการเก็บรักษาถูกกำหนดโดยลักษณะปรากฏของคุณภาพโดยรวม โดยกำหนดให้ผักกาดหวานหมดอายุการเก็บรักษา เมื่อมีลักษณะปรากฏของคุณภาพโดยรวมต่ำกว่าคะแนนระดับ 3 คะแนน ซึ่งบ่งบอกว่าผู้ประเมินเริ่มไม่ยอมรับในผลิตผลนั้นๆ

การบันทึกผลการทดลอง

การประเมินคุณภาพทางกายภาพ

1. ลักษณะปรากฏ บันทึกโดยการให้คะแนนลักษณะปรากฏตามระดับคะแนน ดังนี้

ระดับคะแนน	5	หัวมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียว และไม่มีอาการเหี่ยวหรือแห้ง (ความสด) คิดเป็น 81-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน	4	หัวมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียว และไม่มีอาการเหี่ยวหรือแห้ง (ความสด) คิดเป็น 61-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน	3	หัวมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียว และไม่มีอาการเหี่ยวหรือแห้ง (ความสด) คิดเป็น 41-60 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด * หมดอายุในการเก็บรักษา
ระดับคะแนน	2	หัวมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียว และไม่มีอาการเหี่ยวหรือแห้ง (ความสด) คิดเป็น 21-40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
ระดับคะแนน	1	หัวมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียว และไม่มีอาการเหี่ยวหรือแห้ง (ความสด) คิดเป็น 0-20 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

2. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

วัดโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง BA3100P นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

เปอร์เซนต์การสูญเสียน้ำหนัก=$\frac{\text{น้ำหนักผักก่อนการเก็บรักษา-น้ำหนักผักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักผักก่อนการเก็บรักษา}}\times 100$

3. สีของใบ

วัดโดยใช้เครื่อง Chroma meter รุ่น CR300 หัววัด CR-310 ของบริษัท Minolta และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 โดยการวัดที่ตำแหน่งกลางใบ ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L*, chroma และ hue angle

การประเมินคุณภาพทางเคมี

1. ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในผักกาดหวานด้วยวิธี Indophenol โดยนำตัวอย่างผักที่ปั่นละเอียด 10 กรัม เติมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จากนั้นดูดสารละลายที่กรองได้ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายจะมีสีชมพูประมาณ 15 วินาที คำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาณ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล เทียบกับสารตัวอย่าง เทียบกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้กับวิตามินซีมาตรฐาน โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1997)

ปริมาตร indophenols dye a มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)

ปริมาตร indophenols dye b มิลลิลิตร มี ascorbic acid เท่ากับ (1×b)/a มิลลิกรัม

(จากสารละลายตัวอย่าง) เท่ากับ c มิลลิกรัม

สารละลาย	10	มิลลิลิตร มี ascorbic acid	เท่ากับ c มิลลิกรัม
สารละลาย	100	มิลลิลิตร มี ascorbic acid	เท่ากับ (c×100)/10 มิลลิกรัม
			เท่ากับ d มิลลิกรัม
เนื้อตัวอย่าง	10	กรัม มี ascorbic acid	เท่ากับ d มิลลิกรัม
เนื้อตัวอย่าง	100	กรัม มี ascorbic acid	เท่ากับ (d×100)/10 มิลลิกรัม

เท่ากับ e มิลลิกรัม / 100 กรัมน้ำหนักสด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2. ปริมาณคลอโรฟิลล์ ตามวิธีการของ Whitham *et al.* (1971)

ชั่งตัวอย่างผักกาดหวานที่ปั่นละเอียด 1 กรัม เติมสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับปริมาตรด้วยสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ} = [12.7(OD_{663} - 2.69(OD_{645}))] \times \frac{v}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี} = [22.9(OD_{645} - 4.69(OD_{663}))] \times \frac{v}{1{,}000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = [20.2(OD_{645} - 8.02(OD_{663}))] \times \frac{v}{1{,}000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของผักกาดหวานที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่อง Spectrophotometer ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

3. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer) รุ่น PR-101 ของบริษัท Atago อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-45 เปอร์เซ็นต์ โดยอ่านค่าจากน้ำของผักกาดหวานที่ปั่นรวมกัน

4. หลักเกณฑ์การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษาของผักกาดหวาน

กำหนดให้ผักกาดหวานหมดอายุการเก็บรักษา เมื่อมีลักษณะปรากฏที่คะแนนเท่ากับหรือน้อยกว่า 3 คะแนน ซึ่งผักกาดหวานมีความสดอยู่ระหว่าง 41-60 เปอร์เซ็นต์

5. กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Manthey (2004)

หั่นผักกาดหวานให้ละเอียด แล้วเติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนผักแข็งตัว นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเมล็ดกาแฟ จากนั้นชั่งตัวอย่างผักกาดหวานที่ปั่นละเอียดมา 20 กรัม เติมสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป แล้วนำสารละลายไปเขย่าในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ดูดสารละลาย 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายอีกครั้งด้วย syringe nylon filter ขนาด 0.45 μm นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วเติม DPPH solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเขย่าเพื่อให้สารทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดจากผักเป็น blank

นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็นไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

6. ปริมาณสารประกอบฟีนอล ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Sellappan *et al.* (2002)

นำสารสกัดที่ผ่านการกรองด้วย syringe nylon filter 0.45 μm ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร โซเดียมคาร์บอเนต 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 375 ไมโครลิตร จากนั้นวางทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีแล้วเติม Folin-Ciocalteau solution ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปเขย่าในสภาพมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายที่ปราศจากสารสกัดผักมาเป็น blank

นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอล มีหน่วยเป็นไมโครกรัมเทียบกับกรดแกลลิกต่อน้ำหนักตัวอย่างสด 1 กรัม (Microgram Gallic Acid Equivalent/g Fresh Weight)

7. อัตราการหายใจ

นำผักกาดหวานทั้งสองกรรมวิธีไปชั่งน้ำหนักให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน โดยแต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำๆ ละ 1-2 ต้น นำมาบรรจุลงในกล่องพลาสติกขนาด 13×18.7×9.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำกล่องพลาสติกที่บรรจุผักกาดหวานต่อเข้ากับชุดแผงควบคุมอัตราการไหลของอากาศ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส นำมาหาอัตราการหายใจ ดัดแปลงตามวิธีของ claypool and Keefer (1942) โดยวัดอัตราการหายใจทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา โดยทำการวัดความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซออกซิเจนโดยเครื่อง gas chromatography รุ่น GC-8A ของบริษัท SHIMADZU วัดอัตราการหายใจทุกวันจนหมดอายุการเก็บรักษา แล้วนำมาคำนวณอัตราการหายใจโดยคำนวณจากสูตร (Smith, 1995)

อัตราการหายใจ (มิลลิกรัม CO_2 /กิโลกรัม/ชั่วโมง)

$$= \frac{(\%CO_2\text{-blank}\%CO_2)\times \text{flow rate (ml/min)} \times 321750 \text{ mg kg}^{-1} \text{ hr}^{-1}}{\text{Weight (g)} \times (273 + \text{measured flow rate Temp °C})}$$

การทดลองที่ 3 ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนของผักกาดหวานหั่นชิ้น [ศึกษาการปนเปื้อนด้านจุลินทรีย์ โดยตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (total microbial count) ตามวิธีการของ Kiss (1984)]

นำผักกาดหวานที่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศโดยใช้พารามิเตอร์ที่เหมาะสมมากที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการวิเคราะห์ค่า Mean มี 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ผักกาดหวานที่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศ

กรรมวิธีที่ 2 ผักกาดหวานที่ไม่ผ่านการลดอุณหภูมิโดยใช้ระบบสุญญากาศ (control)

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างผักกาดหวานหั่นชิ้นประมาณ 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตน จำนวน 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหวานที่มีความเจือจางเป็น 2×10^{-1} ใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างข้างต้น ใส่ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มีสารละลายบัฟเฟอร์

เปปโตนอยู่แล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหวานที่มีความเจือจาง 2×10^{-2} ทำการเจือจางตัวอย่างผักกาดหวานไปเรื่อยๆ ตามวิธีการข้างต้น จนได้สารละลายตัวอย่างผักกาดหวานหั่นชิ้นที่มีความเจือจางที่เหมาะสม (ประมาณ 2×10^{-4}-2×10^{-7})

การใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างผักกาดหวานที่มีความเจือจางระดับต่างๆ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยสารละลายตัวอย่างแต่ละระดับความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่หลอมเหลวประมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างผักกาดหวานอยู่ ผสมสารละลายตัวอย่างผักกาดหวานและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วปิดผนึกรอบด้วยพาราฟิล์ม สำหรับชุดควบคุมใช้สารละลายบัฟเฟอร์เปปโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างผักกาดหวาน นำจานเพาะเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้วไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 24±3 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดระยะเวลาแล้ว ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ จำนวนโคโลนี/กรัมน้ำหนักสด (logCFU/g)