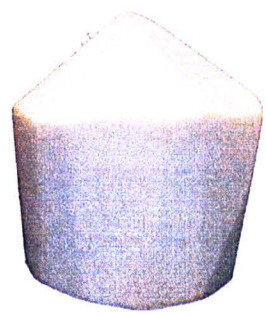
บทที่ 3 ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดออกซาลิกและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและการเกิดเชื้อราบนเปลือกมะพร้าวน้ำหอม

3.1.1 การเตรียมผลมะพร้าวน้ำหอม

นำมะพร้าวน้ำหอมอายุการเก็บเกี่ยว 6 เดือนหลังออกจั่นมาจากสวน อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) โดยคัดเลือกผลที่ไม่มีตำหนิหรือเกิดโรค มาปอกเปลือกสีเขียวออกตัดแต่งผล โดยให้ด้านก้นผลมีปลายแหลมเป็นรูปกรวยป้าน ส่วนทรงผลแต่งให้เป็นรูปทรงกระบอก แล้วด้านหัวผลสอบลงเล็กน้อย และตัดด้านหัวผลให้ตรงเพื่อให้สามารถตั้งได้ดังปรากฏในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่ง

3.1.2 การเตรียมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและการเกิดเชื้อรา

เตรียมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลคือ สารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ สารป้องกันการเกิดราคือ สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) โดยการเตรียมสารละลายแต่ละทรีตเมนต์เตรียมปริมาตร 10 ลิตร เพื่อใช้กับมะพร้าว 50 ลูก

3.1.3 วิธีการทดลอง

แช่มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 ลงในสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและป้องกันการเกิดเชื้อรา โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีตเมนต์ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น (control)
ทรีทเมนต์ที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control)
ทรีทเมนต์ที่ 3 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์
ทรีทเมนต์ที่ 4 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
ทรีทเมนต์ที่ 5 แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
ทรีทเมนต์ที่ 6 แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์
มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งแช่ในสารละลายแต่ละทรีตเมนต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ออกแบบการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ

3.1.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 วัน โดยบันทึกผลการทดลองดังนี้

3.1.4.1 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกมะพร้าว

โดยใช้เครื่องวัดสี (colorimeter) ยี่ห้อ Konoka Minolta รุ่น Chroma meter CR-400 โดยให้หัววัดแนบสัมผัสกับด้านบนและด้านข้างมากที่สุด และรายงานผลเป็นค่า Δ L* Δ a* Δ b* Δ Hue angle และ Δ E value ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

ค่า L* เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสีมีค่าตั้งแต่ 0-100
กรณีที่ค่า L* มีค่าสูง หมายถึง มีความสว่างมาก
กรณีที่ค่า L* มีค่าต่ำ หมายถึง มีความสว่างน้อยหรือสีเข้มมาก
โดยค่า Δ L* คำนวณจาก $\sqrt{(L^*-L_0^*)^2}$

ค่า a* เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียว-สีแดง
กรณีที่ค่า a* มีค่าเป็นลบ หมายถึง สีที่ปรากฏอยู่ในช่วงสีเขียว
กรณีที่ค่า a* มีค่าเป็นบวก หมายถึง สีที่ปรากฏอยู่ในช่วงสีแดง
โดยค่า Δ a* คำนวณจาก $\sqrt{(a^*-a_0^*)^2}$

ค่า b* เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-สีเหลือง
กรณีที่ค่า b* มีค่าเป็นลบ หมายถึง สีที่ปรากฏอยู่ในช่วงสีน้ำเงิน
กรณีที่ค่า b* มีค่าเป็นบวก หมายถึง สีที่ปรากฏอยู่ในช่วงสีเหลือง

โดยค่า Δ b* คำนวณจาก $\sqrt{(b^*-b_0^*)^2}$

ค่า Δ Hue angle เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงค่าโทนสีที่จำแนกสีแดง เหลืองและน้ำเงิน ไปจากค่าเริ่มต้น

กรณีที่ค่า Δ Hue angle สูง หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงค่าโทนสีมาก

กรณีที่ค่า Δ Hue angle ต่ำ หมายถึง มีการเปลี่ยนแปลงค่าโทนสีน้อย

โดยค่า Δ Hue angle คำนวณได้จาก $\sqrt{(\text{Hue angle} - \text{Hue angle}_0)^2}$

ค่า Δ E value เป็นค่าที่รายงานถึง ค่าความแตกต่างของสีผลผลิตที่เปลี่ยนแปลงไปจากวันแรกที่ทำการเก็บรักษา

กรณีที่ค่า Δ E value สูง หมายถึง สีของผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันแรกที่ทำการเก็บรักษามาก

กรณีที่ค่า Δ E value ต่ำ หมายถึง สีของผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงไปจากวันแรกที่ทำการเก็บรักษาน้อย

โดยค่า Δ E value คำนวณได้จากสูตร $\sqrt{(L-L_0)^2+(a-a_0)^2+(b-b_0)^2}$

L_0^* เป็นค่า L* ที่ได้จากการวัดในวันแรกที่เก็บรักษา

a_0^* เป็นค่า a* ที่ได้จากการวัดในวันแรกที่เก็บรักษา

b_0^* เป็นค่า b* ที่ได้จากการวัดในวันแรกที่เก็บรักษา

Hue angle_0 เป็นค่า Hue angle ที่ได้จากการวัดในวันแรกที่เก็บรักษา

3.1.4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลตามวิธีของ Sapers และ Douglas (1987)

นำค่า L ที่วัดได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล} = \frac{\Delta L^* \text{ control} - \Delta L^* \text{ treatment}}{\Delta L^* \text{ control}} \times 100$$

เมื่อ $\Delta L^* = L_t - L_{initial}$

กรณีค่าการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลอยู่ระหว่าง 0-100 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง ทรีทเมนต์นั้นสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้

กรณีค่าการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง ทรีทเมนต์นั้นฟอกสีตัวอย่าง

กรณีค่าการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลต่ำกว่า 0 เปอร์เซ็นต์ หมายถึง ทรีทเมนต์นั้นทำให้เกิดสีน้ำตาลมากขึ้นมากกว่าที่ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล

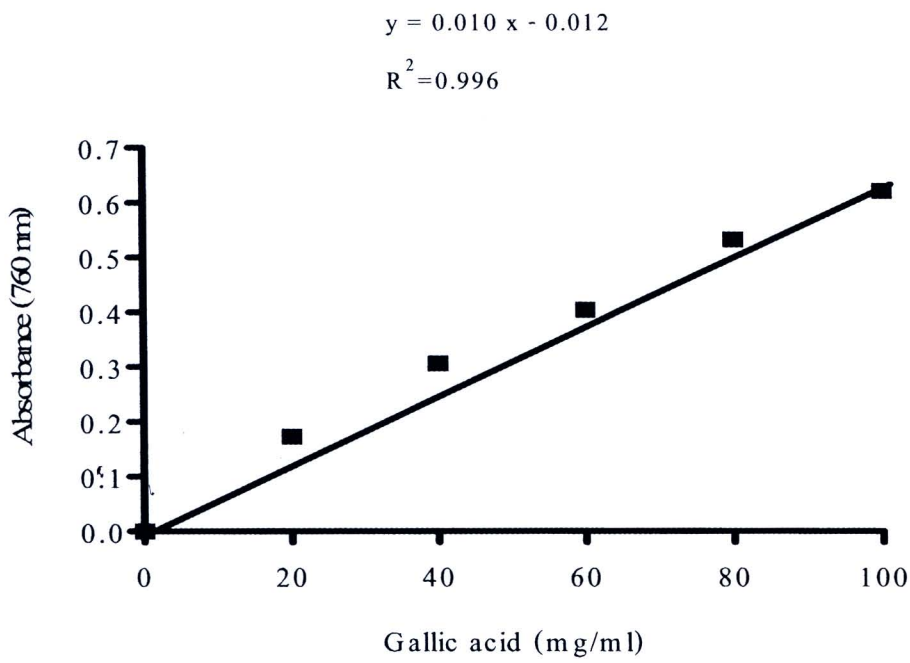
3.1.4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของเปลือกมะพร้าวตามวิธีของ Singleton และ Rossi (1965)

วิธีการสกัดสารประกอบฟีนอล

ชั่งเปลือกมะพร้าวจากทุกตำแหน่งรอบๆ ผลมะพร้าว จำนวน 2 กรัม ผสมกับ ethanol ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดสารประกอบฟีนอลปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสาร folin-ciocalteu ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วเติมสารเช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นวางไว้ที่ห้อง เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วรายงานผลในหน่วย กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (mg/g FW)



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร

3.1.4.4 ประเมินการเกิดราบนผลมะพร้าวน้ำหอม

ประเมินการเกิดราด้วยสายตาเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยแบ่งมะพร้าวแต่ละทรีทเมนต์สำหรับประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทรีทเมนต์ละ 5 ลูก แล้วบันทึกจำนวนมะพร้าวที่เกิดโรค จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนมะพร้าวที่เกิดโรค} \times 100}{\text{จำนวนมะพร้าวทั้งหมด}}$$

ประเมินความรุนแรงการเกิดโรค โดยแบ่งมะพร้าวแต่ละทรีทเมนต์สำหรับประเมินเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรคทรีทเมนต์ละ 5 ลูก แล้วบันทึกพื้นที่ในการเกิดโรคของแต่ละลูกโดย จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรคของแต่ละลูก} = \frac{\text{พื้นที่ในการเกิดโรค} \times 100}{\text{พื้นที่ทั้งหมดของผล}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงการเกิดโรคของแต่ละลูก}}{\text{จำนวนมะพร้าวที่เกิดโรค}}$$

3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการใช้สารละลายกรดออกซาลิกร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ต่อการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและการเกิดเชื้อราบนเปลือกมะพร้าวน้ำหอม

3.2.1 การเตรียมผลมะพร้าวน้ำหอม

การเตรียมผลมะพร้าวน้ำหอมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.1

3.2.2 การเตรียมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและสารป้องกันการเกิดเชื้อรา

เตรียมสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเตรียมสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) โดยการเตรียมสารละลายแต่ละทรีตเมนต์เตรียมปริมาตร 10 ลิตร เพื่อใช้กับมะพร้าว 50 ลูก

3.2.3 วิธีการทดลอง

แช่มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 ลงในสารที่เตรียมในข้อ 3.2.2 โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีทเมนต์ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น (control)

ทรีทเมนต์ที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control)

ทรีทเมนต์ที่ 3 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 4 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 5 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ทรีทเมนต์ที่ 6 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งแช่ในสารละลายแต่ละทรีตเมนต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ออกแบบการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ

3.2.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 วัน โดยบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.4.1-3.1.4.4

3.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของการใช้สารละลายกรดออกซาลิกร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 แล้วหุ้มผลด้วยฟิล์ม PVC ต่อการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและการเจริญของเชื้อราบนเปลือกมะพร้าวน้ำหอม

3.3.1 การเตรียมผลมะพร้าวน้ำหอม

การเตรียมผลมะพร้าวน้ำหอมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.1

3.3.2 การเตรียมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลและป้องกันการเกิดเชื้อรา

เตรียมสารที่ระดับความเข้มเข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 คือ เตรียมสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) โดยการเตรียมสารละลายแต่ละทรีตเมนต์เตรียมปริมาตร 10 ลิตร เพื่อใช้กับมะพร้าว 50 ลูก

3.3.3 วิธีการทดลอง

แช่มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 ลงในสารที่เตรียมในข้อ 3.3.2 โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีตเมนต์ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 แช่ในน้ำกลั่น (control) แล้วหุ้มฟิล์ม PVC

ทรีทเมนต์ที่ 2 แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (positive control) แล้วหุ้มฟิล์ม PVC

ทรีทเมนต์ที่ 3 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วหุ้มฟิล์ม PVC

มะพร้าวน้ำหอมตัดแต่งแช่ในสารละลายแต่ละทรีตเมนต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำมาผึ่งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ออกแบบการทดลองแบบ factorial แต่ละทรีทเมนต์มี 3 ซ้ำ

3.3.4 การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 วัน โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ดังนี้

3.3.4.1 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกมะพร้าว

วัดการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกมะพร้าวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.4.1

3.3.4.2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล

นำค่า L* มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาล ตามสูตรเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.4.2

3.3.4.3 ประเมินการเกิดสีน้ำตาลบนผลมะพร้าว

ประเมินการเกิดสีน้ำตาลบนผลมะพร้าว โดยการประเมินด้วยสายตาของผู้ประเมินที่ไม่ได้ผ่านฝึกฝน จำนวน 10 คน ซึ่งมีเกณฑ์การให้คะแนนการเกิดสีน้ำตาลดังนี้

1 คะแนน คือ เกิดสีน้ำตาล 0 เปอร์เซ็นต์

2 คะแนนคือ เกิดสีน้ำตาล 1-10 เปอร์เซ็นต์

3 คะแนนคือ เกิดสีน้ำตาล 11-25 เปอร์เซ็นต์

4 คะแนนคือ เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์

3.3.4.4 ประเมินการเกิดราบนผลมะพร้าวน้ำหอม

ประเมินการเกิดเชื้อราบนเปลือกมะพร้าวน้ำหอมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.1.4.4

3.3.4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

ใช้เครื่อง Hand refractometer (Atago รุ่น N1) วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำหรือ Total soluble solids (TSS) ในน้ำมะพร้าว โดยค่าที่อ่านได้รายงานเป็นองศาบริกซ์ (°brix)

3.3.4.6 ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำมะพร้าว

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH-meter

3.3.4.7 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้

วัดปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรต โดยนำน้ำมะพร้าวมา 5 มิลลิลิตร หยด phenophthaline ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นไทเทรตกับ NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติคือ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนอย่างน้อย 30 วินาที แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริก ดังสมการนี้

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

โดย meq.wt.citric acid = 0.064

3.3.4.8 วัดปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำมะพร้าว (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC No. 923. 03 1995)

วัดปริมาณกรดไขมันอิสระที่อยู่ในรูปกรด lauric โดยนำน้ำมะพร้าวมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมเบนซีน 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างสม่ำเสมอนาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จาก นั้นปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยด phenophthaline ปริมาณ 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นไทเทรตกับ KOH ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนถึงจุดยุติคือ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน นำค่า KOH ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดไขมันอิสระ โดยเทียบกับ blank คือ เบนซีน โดยเติมเบนซีนปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารอื่นๆ เช่นเดียวกับตัวอย่าง เมื่อได้ปริมาณ KOH แล้วนำมาแทนค่าในสูตร ดังนี้

$$\text{กรดไขมันอิสระ (มิลลิกรัม KOH/100 ml น้ำมะพร้าว)} = \frac{(a-b) \times \text{นอร์มัล KOH} \times 20 \times 2.5}{\text{น้ำหนักไขมัน}}$$

a = มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

b = มิลลิลิตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต blank

20 = แฟกเตอร์ในการคำนวณเทียบเป็น lauric acid

2.5 = โมลของเบนซีน

3.3.4.9 ค่าความใสของน้ำมะพร้าว

วัดความใสโดยนำน้ำมะพร้าวมาวัดค่า transmission ที่ 610 nm (Campos และคณะ, 1996) เทียบกับน้ำกลั่น แล้วนำมาคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความใส} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมะพร้าว ณ วันที่วัด} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมะพร้าว ณ วันแรกของการเก็บรักษา}}$$

3.3.4.10 กิจกรรมเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO) ดัดแปลงจากวิธีของ Duan และคณะ (2007)

3.3.4.10.1 วิธีการสกัดเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO)

ทำการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ PPO โดยการชั่งเปลือกมะพร้าวจากส่วนต่างๆ รอบผลมะพร้าวมาจำนวน 5 กรัม เติมสารละลาย sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และสาร polyvinyl pyrollidone จำนวน 0.5 กรัม จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่แรงเหวี่ยง 19,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ PPO และปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง

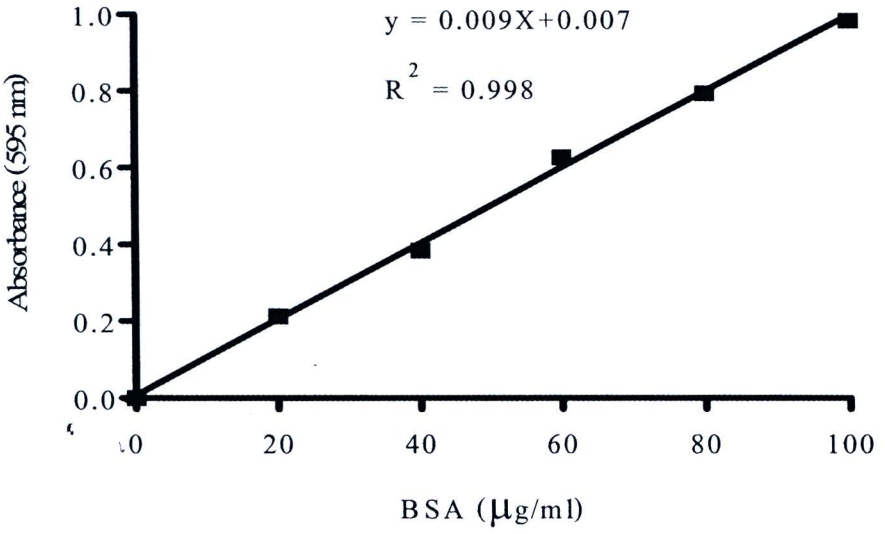
3.3.4.10.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO)

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้มาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 4-methyl catechol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลานาน 2 นาที โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 30-90 วินาที โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปคำนวณในหน่วย ΔOD_{410}/ มิลลิกรัมโปรตีน/ นาที

3.3.4.10.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) โดยชั่ง BSA จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA มาเจือจางด้วยสารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เพื่อให้ได้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายที่เจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับ comassie Brilliant Blue ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.3 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA กับค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POD

การเตรียม Comassie Brilliant Blue G-250

ชั่ง comassie Brilliant Blue G-250 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย phosphoric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 2 และนำไปเก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ PPO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.3.4.10.1) เติมลงในหลอดทดลอง แล้วเติม coomassie blue ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้สารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 แทนสารละลายส่วนใส นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

3.3.4.11 กิจกรรมเอนไซม์ Peroxidase (POD) ดัดแปลงจากวิธีของ Zhang และคณะ (2005)

3.3.4.11.1 วิธีการสกัดเอนไซม์ Peroxidase (POD)

ทำการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ POD โดยการชั่งเปลือกมะพร้าวจากส่วนต่างๆ รอบผลมะพร้าวมาจำนวน 5 กรัม เติมสารละลาย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 20

มิลลิลิตร และสาร polyvinyl pyrollidone จำนวน 0.5 กรัม จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่แรงเหวี่ยง 19,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ POD และปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง

3.3.4.11.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase (POD)

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ POD โดยดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ substrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกันอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้รายงานเป็น ΔOD_{470} / มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

3.3.4.11.3 วิธีการเตรียม substrate

นำ guaicol ปริมาตร 0.248 มิลลิลิตร ใส่ลงใน sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเติม H_2O_2ปริมาตร 666.66 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ขวดหุ้มฟอยด์ แล้วเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3.4.11.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง

ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ (Bradford, 1976) โดยวิธีการวัดเช่นเดียวกับเอนไซม์ PPO ข้อ 3.3.4.10.3

3.3.4.12 กิจกรรมเอนไซม์ Phenylalanine amonialyase (PAL) ดัดแปลงจากวิธีของ Jiang และ Joyce (2003)

3.3.4.12.1 วิธีการสกัดเอนไซม์ Phenylalanine amonialyase (PAL)

ทำการสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ PAL โดยการชั่งเปลือกมะพร้าวจากส่วนต่างๆ รอบผลมะพร้าวมาจำนวน 5 กรัม เติมสารละลาย 0.1 M sodium borate buffer pH 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์ดังกล่าวประกอบด้วย 5 mM β-mercaptoethanol และ 2 mM EDTA และเติมสาร polyvinyl pyrollidone จำนวน 0.5 กรัม จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่แรงเหวี่ยง 19,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ PAL และปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง

3.3.4.12.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine amonialyase (PAL)

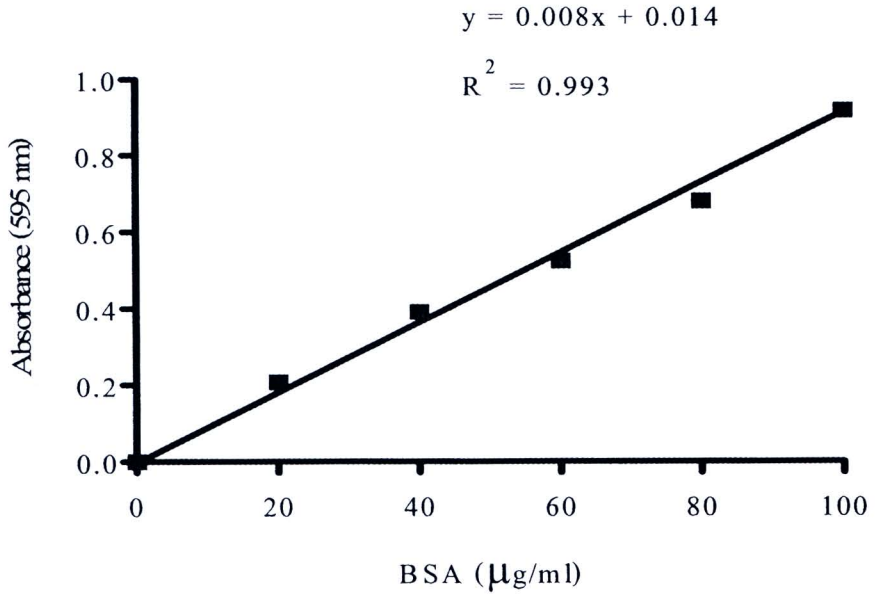
ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M sodium borate buffer pH 8.0 ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย

0.1 mM L-phenylalanine บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้รายงานเป็น ΔOD_{290} / มิลลิกรัมโปรตีน/ นาที

3.3.4.12.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) โดยชั่ง BSA จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย sodium borate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีโปรตีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย BSA มาเจือจางด้วยสารละลาย sodium borate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 เพื่อให้ได้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.4 กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA กับค่าดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ PAL

การเตรียม Comassie Brilliant Blue G-250

ชั่ง comassie brilliant blue G-250 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย phosphoric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 2 และนำไปเก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ PAL ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง แล้วเติม coomassie blue ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้สารละลาย 0.1 M sodium borate buffer pH 8.0 แทนสารละลายส่วนใส นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

3.3.4.13 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคโดยผู้ประเมินที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนมาก่อนจำนวน 10 คน ด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความใส การยอมรับโดยรวม และประเมินการเกิดสีน้ำตาลบนเปลือก ใช้วิธีการให้คะแนนการยอมรับแบบ hedonic scale (ภาคผนวก ข แบบประเมินผลทางประสาทสัมผัสมะพร้าวน้ำหอม)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม SAS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์