บทที่ 3
วัตถุดิบ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลมะม่วง (*Mangifera indica* L.) พันธุ์แก้ว (Kaew) เขียวเสวย (Keaw Sawoey) โชค-อนันต์ (Chok-Anan) น้ำดอกไม้ (Nom Dok Mai) มหาชนก (Maha-Chanok) และหนังกลางวัน (Nang klang Wan) ที่เก็บเกี่ยวมาจากสวนเกษตรกรในอำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ เป็นผลมะม่วงดิบที่มีความแก่ทางการค้า เปลือกมีสีเขียว ไม่ถูกทำลายจากโรคและแมลง น้ำหนัก ของผลมะม่วงที่ใช้ทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 น้ำหนักของผลมะม่วงจำนวน 6 พันธุ์

พันธุ์	น้ำหนัก (กรัม)
แก้ว	250-310
เขียวเสวย	300-390
โชคอนันต์	330-380
น้ำดอกไม้	420-500
มหาชนก	350-490
หนังกลางวัน	370-500

คัดเลือกผลมะม่วงที่มีระยะความแก่ใกล้เคียงกัน โดยใช้ผลมะม่วงที่มีค่าความถ่วงจำเพาะที่มากกว่า 1.0 โดยการจม-ลอยน้ำประปา ล้างผลมะม่วงด้วยน้ำประปาอีก 1 ครั้ง ผึ่งให้ผิวนอกแห้ง แล้วนำผลมะม่วงไปเก็บรักษาไว้ในห้องที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80% สุ่มผลมะม่วงมาวิเคราะห์คุณภาพทุกวันจนผลมะม่วงสุกงอม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Model C831, Consort, Turnhout, Belgium)
2. เครื่องไทเทรตกรดอัตโนมัติ (Automatic Tritrator, Model 230, TitroLine easy, SCHOTT, Belgium)
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 0-45% (Digital refractometer, Model PR-101, Atago, Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, SPECORD 40, Analytik Jena, Germany)
5. เครื่องวัดสี (Colorimeter, ColorQuestXE, HunterLab, Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA)
6. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer, TA-XT2i/50, Stable Micro Systems,Ltd., Godalming, UK)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, MIKRO 22R, Hettich, Minnesota, USA)
8. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance, PB1502-S, Mettler Toledo, Switzerland)
9. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance, AB204-S, Mettler Toledo, Switzerland)
10. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate stirrer, HTS-1003, LMS, Tokyu, Japan)
11. ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer, Sharp, Model FR-148E, Thailand)
12. ตู้ดูดควัน (Hood, Top lab Design and Technology, England)
13. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Heat circulate water bath,YCW-010, Taipei, China)
14. เครื่องปั่น (Blender, AAW9, Moulinex, Indonesia)
15. ปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 50-200 ไมโครลิตร (Auto pipette, Gilson, Paris, France)
16. ปิเปตต์อัตโนมัติ ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร (Auto pipette, Wiggen Hauser, Berlin Germany)
17. กรวยแยก (Separating funnel, 250 ml, China)
18. ควอร์ซคิวเวตต์ (Quartz Cuvette)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

19. กระดาษกรอง เบอร์ 1, 2 และ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Filter paper , Whatman, England)
20. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis power supply, EPS 301, Amersham Biosciences/GE healthcare, Uppsala Sweden)
21. ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Vertical electrophoresis system, Hoefer miniVE, Amersham Biosciences/GE healthcare, California USA)
22. แผ่นกระจก ขนาด 10 x 10 cm (Glass plate, SE262P-5, Amersham Biosciences /GE healthcare, New Jersey USA)

3.3 การศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ก. **สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี**

(1) สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Fisher, UK) น้ำหนัก 6.05 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.2 โดยเติมสารละลายกรดไฮโดร - คลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(2) สารละลาย extraction buffer: ชั่ง Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Amersham Biosciences/GE Healthcare, USA) มา 1.5 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 จากข้อ (1) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติม 2-mercaptoethanol (BIO-RAD, USA) 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 จากข้อ (1) โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(3) สารละลาย SDS 10%: ชั่ง SDS (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, USA) 1.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 10 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(4) 40% Acrylamide/Bis solution 29:1 (BIO-RAD, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(5) สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ พีเอช 8.8 : ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Fisher, UK) น้ำหนัก 22.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้เป็น 8.8 โดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(6) สารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8: ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Fisher, UK) น้ำหนัก 7.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้เป็น 6.8 โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(7) สารละลาย electrode buffer (Tris 0.0083 M-glycine 0.192 M., พีเอช 8.3 ที่มี SDS 0.1%): ชั่ง Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Fisher, UK) น้ำหนัก 4.02 กรัม ไกลซีน (Amersham Biosciences/GE Healthcare, USA) 57.76 กรัม และ SDS (Amersham Biosciences/GE Healthcare, USA) 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 3.5 ลิตร ปรับค่าพีเอชให้เป็น 8.3 โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 4.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

(8) สารละลาย ammonium persulphate 10%: โดยชั่ง ammonium persulphate (BIO-RAD, USA) น้ำหนัก 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้)

(9) สารละลาย sample buffer: ชั่ง bromophenol blue (BIO-RAD, USA) น้ำหนัก 0.0125 กรัม ละลายในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8 จากข้อ (6) ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล (glycerol) (Merck, Germany) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม SDS (Amersham Biosciences/ GE Healthcare, USA) 1 กรัม ค่อยๆ คนจน SDS ละลายหมด เติม 2-mercaptoethanol (Bio-RAD, USA) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วปรับให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

(10) สารละลายสีย้อม (Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1% ที่มีเมทานอล 50% และกรดแอซีติก 10%): ชั่ง Coomassie Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD, USA) 1.00 กรัม ละลายในเมทานอล (Merck, Germany) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอซีติกเข้มข้น (Merck, Germany) จำนวน 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนสีละลายหมด ปรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง สารละลายนี้เมื่อใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ได้อีก 2-3 ครั้ง

(11) สารละลาย destainner (เมทานอล 25% ที่มีกรดแอซีติก 7%) ตวงเมทานอล (Merck, Germany) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอซีติกเข้มข้น (Merck, Germany) ลงไป 140 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 2.0 ลิตร สารละลายนี้เมื่อใช้แล้ว สามารถนำสารละลายที่ล้างครั้งหลังๆ กลับมาใช้ได้อีก

(12) Full range rainbow molecular weight markers (Amersham Biosciences/GE healthcare, USA) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 225,000-12,000 กิโลดาลตัน

ข. การสกัดโปรตีนจากเนื้อมะม่วง

ชั่งเนื้อมะม่วงตัวอย่างละ 3 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งที่แช่เย็น จากนั้นเติม extraction buffer (SDS 1.5% (W/V) ที่มี 2-mercaptoethanol 10% (W/V) และ 0.5 M Tris-HCl buffer พีเอช 6.2 จากข้อ (2) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป แล้วน้ำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง จากข้อ 3.2.7 ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตต์เอาเฉพาะส่วนที่ใสเก็บไว้ใน micro centrifuge สารที่สกัดได้จากเนื้อมะม่วงเรียกว่าสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบผสมกับ sample buffer จากข้อ (9) ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำสารละลายตัวอย่างไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (Harris et al., 1990)

วิธีวิเคราะห์

- **การหารูปแบบของโปรตีน โดยวิธี เอสดีเอส –พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE)**

1. วิธีการเตรียมเจล

ก. การเตรียม 10% separating gel ผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.75 โมลาร์ พีเอช 8.8	5.00	มิลลิลิตร
Acrylamide 40% ที่มี Bis Solution (29:1)	2.50	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	2.35	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร
Ammonium persulphate 10%	0.05	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	10.00	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. การเตรียม 4% stacking gel ผสมสารละลายต่างๆ ดังนี้

Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ พีเอช 6.8	2.52	มิลลิลิตร
Acrylamide 30% ที่มี Bis Solution (29:1)	0.50	มิลลิลิตร
SDS 10%	0.05	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.92	มิลลิลิตร
TEMED	0.005	มิลลิลิตร
Ammonium persulphate 10%	0.025	มิลลิลิตร
ปริมาตรรวม	5.00	มิลลิลิตร

2. การเตรียมเจลแผ่น

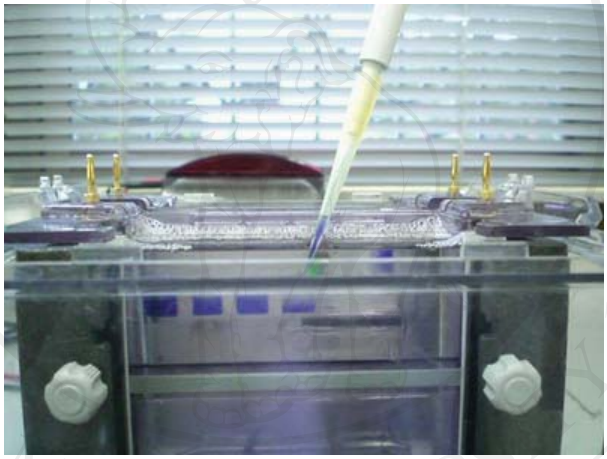
นำแผ่นกระจกสำหรับใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จำนวน 2 แผ่นประกบเข้าด้วยกัน โดยมี spacer คั่นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองด้าน นำไปตั้งบนฐาน ใช้สกรูยึดแผ่นกระจกกับฐานรองให้แน่น ผสมสารละลาย separating gel เข้าด้วยกัน แล้วปิเปตต์ separating gel ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ค่อยๆ ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปปิดผิวหน้าเจล วางไว้ให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว เทน้ำกลั่นที่ปิดผิวหน้าเจลออกไป แล้วเติมสารละลาย stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบนเจลที่เตรียมไว้ ให้เกือบเต็มช่องระหว่างแผ่นกระจก แล้วจึงเสียบหวีตามทันทีเพื่อทำให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่สารละลายตัวอย่าง วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัว ดังภาพที่ 3.1 แล้วจึงค่อยๆ ดึงหวีออก นำกระจกไปประกอบกับ chamber ที่มี electrode buffer อยู่ประมาณครึ่งหนึ่ง เติม electrode buffer ลงใน chamber จนท่วมเส้นลวด

3. การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

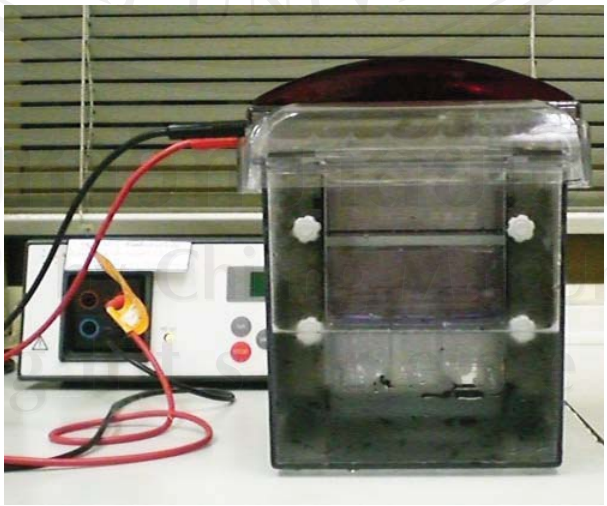
ปิเปตต์สาร สกัดหยาบจากแต่ ละตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เท่ากัน หยอดลงในช่องว่างบน stacking gel ดังภาพที่ 3.2 ส่วนด้านข้างระหว่างช่องเจลของตัวอย่าง เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงไป ต่อสายไฟจากเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง เข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับ chamber ด้านซ้ายและด้านขวา ตามลำดับ เปิดสวิทซ์ของเครื่องจ่ายไฟ โดยใช้กระแส 20 มิลลิ-แอมแปร์ต่อช่องเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง (ภาพที่ 3.3) จนกระทั่งสีของ bromophenol blue ที่ผสมอยู่ใน sample buffer จากข้อ (9) วิ่งลงมาห่างจากขอบกระจกด้านล่าง ประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิทซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นกระจกออกจาก chamber วัดระยะห่างระหว่างขอบเจลกับ bromophenol blue ค่อยๆ แกะแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก นำเจลมาวางไว้ในกล่องพลาสติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3.1 วิธีการเตรียมเจลแผ่นสำหรับแยกโปรตีน



ภาพที่ 3.2 การหยอดสารละลายตัวอย่างลงในเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 3.3 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) ที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การย้อมสีโปรตีนโดยใช้ Coomassie Brilliant Blue R-250

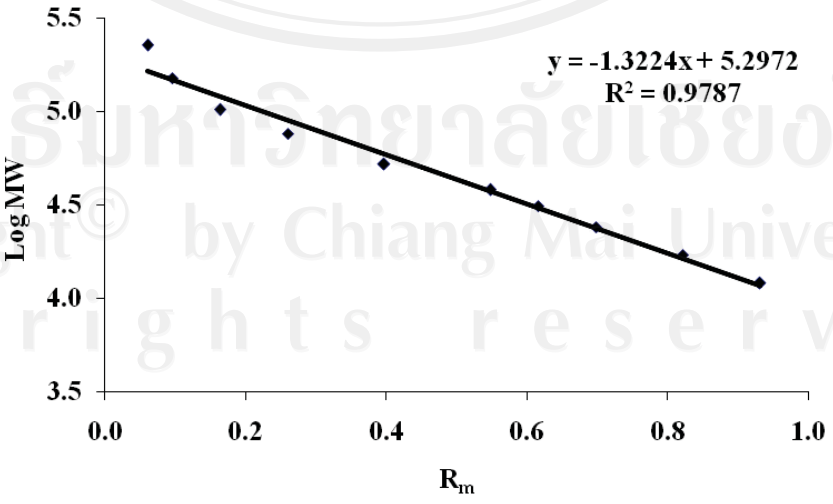
เทสารละลายสีย้อม [ข้อ (10)] ลงไปให้ท่วมแผ่นเจลในกล่องพลาสติก นำไปวางบนเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนสารละลายในกล่องพลาสติกเป็นสารละลาย destainner เพื่อล้างสีย้อมที่ไม่จับกับโปรตีนออก เปลี่ยนสารละลาย destainner บ่อยๆ จนเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน วัดระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับความยาวแถบที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ เพื่อคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_m)

2. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

วัดการเคลื่อนที่ของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน แต่ละชนิดที่ทราบน้ำหนัก โมเลกุลที่แน่นอน จากการเคลื่อนที่ไปใน separating gel แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด จากสมการ

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ (relative mobility, } R_m\text{)} = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนแต่ละแถบเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ bromophenol blue เคลื่อนที่}}$$

นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_m) ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดมาเขียนรูปกราฟกับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ดังภาพที่ 3.4 จากนั้นนำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อมะม่วง ไปเปรียบเทียบเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละแถบจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน



ภาพที่ 3.4 กราฟความสัมพันธ์ของค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า R_m

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก. สีเปลือกและเนื้อของผลมะม่วง

หลักการ

ในการวัดค่าสีที่วัดได้จากเครื่องวัดสี ColorQuestXE ค่าสีที่วัดได้ตามระบบ CIE เป็นค่า L*, a*, b*, C* และ H^{o} โดยค่า

L* = The lightness factor values

ถ้าค่า L* เท่ากับ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีขาว และถ้าค่า L* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

a* = เป็นค่าแสดงสีแดงและสีเขียวของวัตถุ

ถ้าค่า a* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีแดง ถ้าค่า a* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีเขียว

b* = เป็นค่าแสดงสีเหลืองและสีน้ำเงินของวัตถุ

ถ้าค่า b* เป็นบวก (+) แสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง ถ้าค่า b* เป็นลบ (-) แสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน ถ้าค่า ทั้ง a* และ b* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

C* = เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้าค่า C* เท่ากับ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา หากมีค่าเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าวัตถุมีความเข้มของสีมากขึ้น โดยค่า C* คำนวณได้จาก

Chroma; $C^{*} = SQRT (a^{2} + b^{2})$

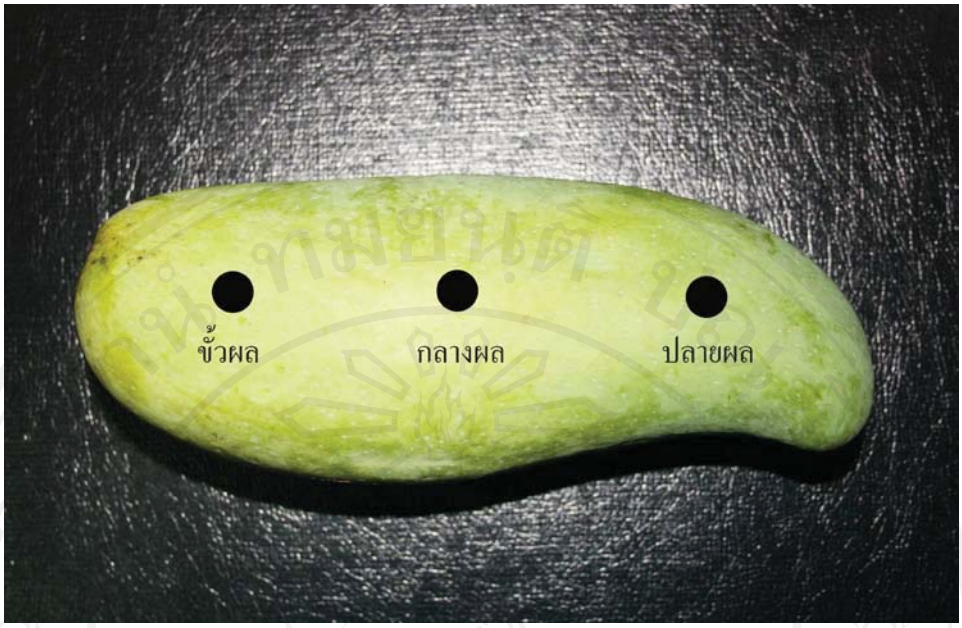
H^{o} = เป็นค่าแสดงสีที่ปรากฏให้เห็น คำนวณในรูปขององศาในวงกลม ซึ่งจะมีค่าเริ่มต้นตั้งแต่ 0^{o} จนถึง 360^{o} ซึ่งค่า H^{o} นี้บอกถึงสีที่แท้จริงของวัตถุที่ปรากฏให้เห็น โดยสีในแถบแกนหลักได้แก่ 0^{o} และ 360 สีแดง 90^{o} สีเหลือง 180^{o} สีเขียว และ 270^{o} สีน้ำเงิน โดยค่า H^{o} คำนวณได้จาก

Hue angle; H^{o} = ATAN (b*/a*)/6.2832 X 360 (Ranganna,1986)

วิธีการวัดสี

วัดสีเปลือกของผลมะม่วงด้วยเครื่องวัดสีจากข้อ 3.2.5 โดยวัดบริเวณขั้วผล กลางผล และปลายผล วัดทั้งสองด้านของผลมะม่วง ดังภาพที่ 3.5 วัดสีเนื้อของผลมะม่วงภายหลังปอกเปลือกแล้ว ตำแหน่งที่วัดใช้ตำแหน่งเดียวกับการวัดสีเปลือกของผลมะม่วงทั้งสองด้าน ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละหนึ่งผล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (n = 6x3) โดยก่อนใช้เครื่องวัดสี ColorQuestXE ทุกครั้งทำการปรับมาตรฐานด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐาน (light trap และ white trap) แล้วแสดงค่าสีที่วัดได้ตามระบบ CIE เป็นค่า L*, a*, b*, C* และ H^{o}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.5 ตำแหน่งที่วัดสีเปลือก สีเนื้อ และความแน่นเนื้อของผลมะม่วง

ข. การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลมะม่วง

หลักการ

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลมะม่วงเป็นการวั ดการเปลี่ยนแปลงของความแน่นเนื้อที่เกิดขึ้นในระหว่างการสุก

วิธีการวัด

วัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลมะม่วง ด้วยเครื่อง Texture analyzer จากข้อ 3.2.6 โดยใช้หัววัด (probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (6 mm-diameter probe) ที่ระดับความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที โดยวัดความแน่นเนื้อที่ขั้วผล กลางผล และปลายผล วัดทั้งสองด้านของผลมะม่วง ดังภาพที่ 3.5 ปอกเปลือกและทำการวัดความแน่นเนื้อของ เนื้อมะม่วงอีกครั้ง โดยวัดด้านละ 3 จุด ตำแหน่งใกล้เคียงกับการวัดผลมะม่วงที่ยังไม่ได้ปอกเปลือก ทั้งสองด้านของผลมะม่วง ทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (n = 6x3) บันทึกแรงกดที่ได้เป็นหน่วยนิวตัน (Ranganna, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

ก. ค่าพีเอช

หลักการ

ค่าพีเอช คือ ค่าความเป็นกรด หรือความเป็นด่าง ของสารละลายใดๆ ซึ่งจะผันแปรตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่มีอยู่ในสารละลายนั้นๆ (นิธิยา, 2545)

$pH = - \log [H^+]$ เมื่อ $[H^+]$ คือ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชจะลดลง

วิธีการวัด

นำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด จำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอชข้อ 3.2.1 และก่อนใช้เครื่องวัดพีเอชทุกครั้ง ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องวัดพีเอชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีค่าพีเอช 10.1, 7.1 และ 4.1 ตามลำดับ

ข. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity; TA)

หลักการ

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ ทำโดยการนำตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ ทราบน้ำหนักแน่นอนมาไทเทรตกับสารละลายด่างมาตรฐาน จนถึงจุดยุติ (end point) โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ หรือวัดค่าพีเอช ให้ได้ 8.1 แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดซิตริก

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, E.Merck, Germany) (NaOH, MW= 40.00 g/mol) จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเปรียบเทียบมาตรฐาน (standardization) โดยการไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนพทาเลต (potassium hydrogen phthalate, Fluka, Switzerland) ($C_5H_8KO_4$) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจำนวน 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างเนื้อมะม่วงกับน้ำให้เข้ากัน โดยใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) แล้วนำไปวางบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (ข้อ 3.2.10) นำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (ข้อ 3.2.1) ไทเทรตจนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ทดลอง 3 ซ้ำ นำไปคำนวณหาปริมาตรกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดซิตริก โดยใช้ค่ามาตรฐาน ดังนี้

1 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.07 กรัม (Ranganna,1986)

$$\text{ปริมาณเกรดทั้งหมด (\%) (ในรูปกรดซิตริก)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times 0.07 \times 100}{\text{น้ำหนักเนื้อมะม่วง (g)}}$$

ค. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

วิธีการวัด

นำน้ำคั้นจากเนื้อมะม่วงที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว มาวัดหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วยเครื่อง Digital refractometer (ข้อ 3.2.3) ซึ่งวัดค่าได้ระหว่าง 0-45% แสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์ ก่อนใช้เครื่องปรับให้อ่านค่าได้ 0 โดยใช้น้ำกลั่น

ง. ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดในเนื้อมะม่วง

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

(1) บีตา-แคโรทีนมาตรฐาน (Standard ß-carotene, Fluka, Switzerland)

(2) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, AR grade, E. Merck, Germany) ($CHCl_3$)

(3) แอซีโตน (Acetone, AR grade, E. Merck, Germany) (CH_3COCH_3, MW. = 58.08 g/mol)

(4) เฮกเซน (Hexane, AR grade, J.T. Baker, U.S.A.)

(5) สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน: เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจำนวน 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

(6) สารละลายผสมของแอซีโตน 40% ในเฮกเซน : เตรียมโดยปิเปตต์แอซีโตนจำนวน 400 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีวิเคราะห์

- **การสร้างกราฟบีตา-แคโรทีนมาตรฐาน**

1. ชั่งสารบีตา-แคโรทีนมาตรฐานจากข้อ (1) จำนวน 5 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายบีตา-แคโรทีนมาตรฐานด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 2.5 มิลลิลิตร
2. ปรับปริมาตรสารละลายในข้อ 1 ให้ครบ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ (4)
3. ปิเปตต์สารละลายในข้อ 2 จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจากข้อ (4) จนได้ 50 มิลลิลิตร
4. ปิเปตต์สารละลายในข้อ 3 จำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซน จากข้อ (5)
5. นำสารละลายในข้อ 4 ที่มีความเข้มข้นสูงสุดมาหาค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-500 นาโนเมตร ใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ (5) เป็น blank ได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร
6. ตั้งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดตามที่วัดได้จากข้อ 5 จากนั้น นำสารละลายบีตา-แคโรทีนมาตรฐานในข้อ 4 ทั้งหมดที่เตรียมไว้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายผสมของแอซีโตน 10% ในเฮกเซนจากข้อ (5) เป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้
7. นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ บีตา-แคโรทีนที่มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ (Ranganna, 1986) ดังภาพที่ 3.6

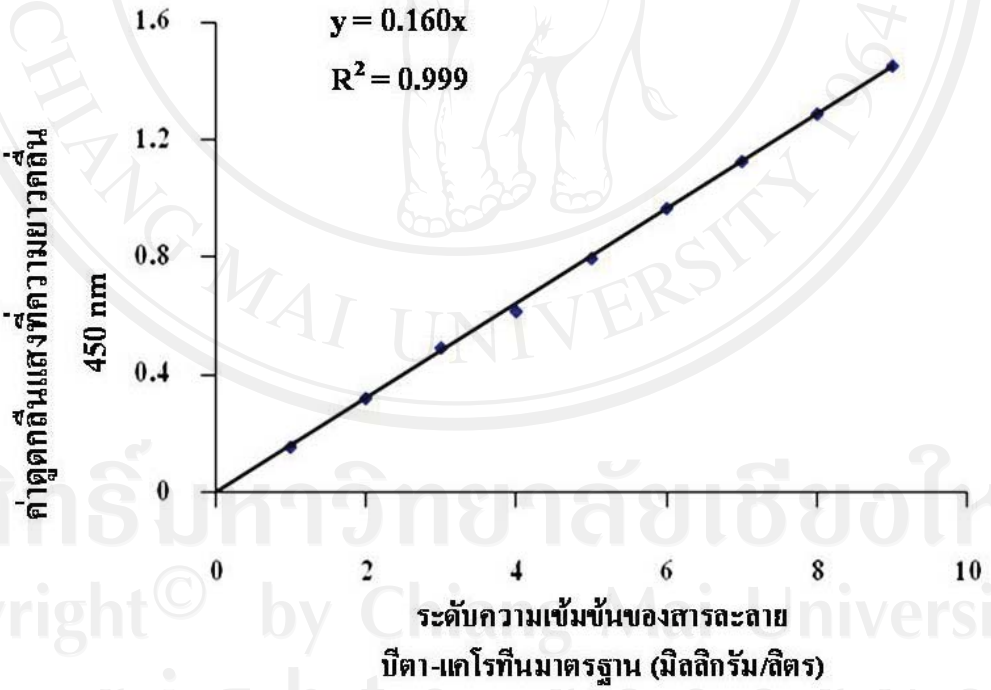
- **วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์**

ชั่งตัวอย่างเนื้อมะม่วงที่ปั่นละเอียดจำนวน 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมแอซีโตน 40% ในเฮกเซนจากข้อ (6) จำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปกวนบนเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้าจากข้อ 3.2.10 เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากข้อ 3.2.19 โดยแยกกากเนื้อมะม่วงกับส่วนใส เก็บส่วนใสใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร จากข้อ 3.2.17 ล้างกากเนื้อมะม่วงด้วยแอซีโตนจำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และ เฮกเซนจำนวน 25 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง นำส่วนใสของแอซีโตนและเฮกเซนที่ใช้ล้างกากไปรวมกับส่วนแรกที่อยู่ในกรวยแยก แล้วล้างแยกเอาชั้นแอซีโตนออก โดยการล้างสารละลายผสมในกรวยแยก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง แยกส่วนของน้ำที่มีแอซีโตนผสมอยู่ออกจากส่วนที่เป็นเฮกเซนที่มีสารแคโรทีนอยด์ละลายอยู่

นำสารละลายแคโรทีนอยด์ในเฮกเซนไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 จากข้อ 3.2.19 โดยรองรับสาร สารละลายแคโรทีนอยด์ด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำสาร ละลายที่กรองได้ไประเหยในตู้ดูดควัน จากข้อ 3.2.12 จนแห้ง นำสารที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายด้วยตัวทำละลายผสมแอซีโตน 10% ในเฮกเซน จากข้อ (5) และปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร นำสารละลายแคโรทีนอยด์ ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ที่ค่าความยาวคลื่นที่ได้จากข้อ 5 (450 นาโนเมตร) บันทึกค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ตัวทำละลายผสม แอซีโตน 10% ในเฮกเซน) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้ทั้ง 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ย (n = 3x3) และนำไปคำนวณหาปริมาณของแคโรทีนอยด์ในเนื้อมะม่วง มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด



ภาพที่ 3.6 บีตา-แคโรทีนมาตรฐานในสารละลายผสม 10% แอซิโตนในเฮกเซน (มิลลิกรัม/ลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

หลักการ

เนื่องจากโปรตีนมีสมบัติในการจับกับ สีย้อม (dye) และมี dye binding capacity สีย้อมที่นิยมใช้จับกับโปรตีน คือ Coomassie Brilliant Blue G-250 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-เบสของการทดลอง ทำให้สีเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ สารสี เปลี่ยนจากที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร ไปเป็น 595 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่เปลี่ยนไปเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของโปรตีน (Hall, 1996)

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

- **สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน**

(1) ใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

(2) สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

(2.1) Stock solution ความเข้มข้น 1%: เตรียมโดยชั่งโปรตีนอัลบูมินมาตรฐาน (Bovine serum albumin, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

(2.2) Working solution ความเข้มข้น 0.02% (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมโดยปิเปตต์สารละลายข้อ (2.1) จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยสารละลายข้อ (1)

(3) สารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250: เตรียมโดยชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% (Ethanol 95%, Food Grade, O. V. Chemical & Supply Ltd., Chiang Mai, Thailand) จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (*ortho*-Phosphoric acid, E. Merck, Germany) จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

ก. การสกัดสารละลายเพื่อวัดปริมาณโปรตีน

ชั่งเนื้อมะม่วงที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นจัดแล้วเติมสารละลายสำหรับสกัด (extraction solution) คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นบดเนื้อมะม่วงให้ผสมเข้ากับสารละลายที่ใช้สกัดในโกร่งบดที่วางในอ่างน้ำแข็งจนเข้ากันดี ประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (ข้อ 3.2.7) ความเร็ว 3,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude enzyme) ไปใช้ในการวัดปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

- **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding**

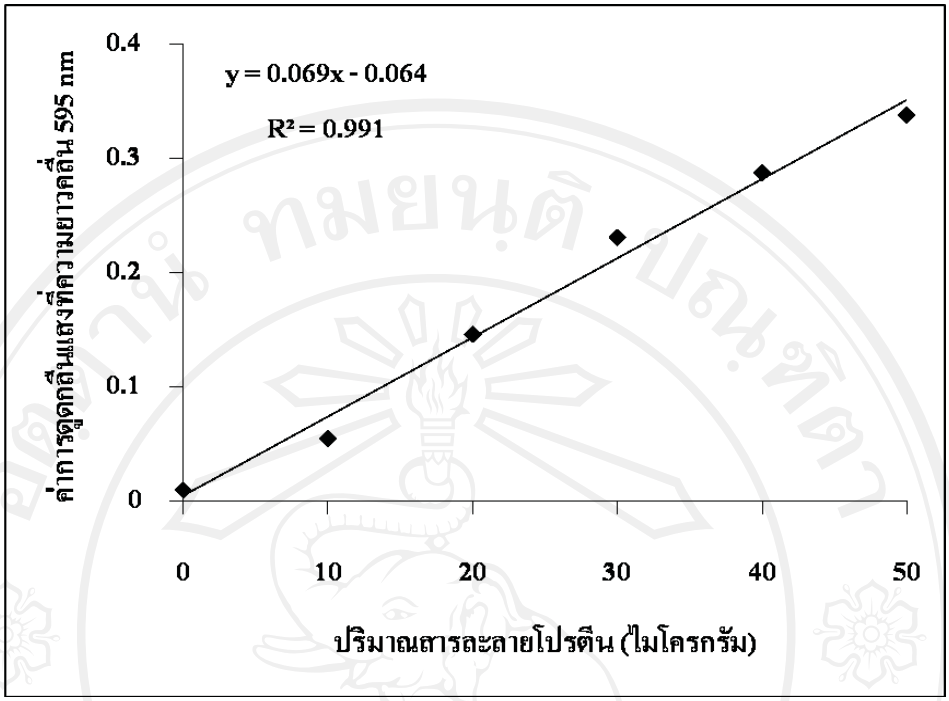
(1) การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin) จากข้อ 2.2 ความเข้มข้น 0.02% จำนวน 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้มีปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายสีย้อมลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้ววางไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยมีสารละลายที่ไม่มีโปรตีนมาตรฐานเป็น Blank (Bradford, 1976)

(2) การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตต์สารสกัดหยาบ จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายสีย้อมจากข้อ (3) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้ววางไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงจากข้อ 3.2.1.4 ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน ดังภาพที่ 3.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.7 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองทางกายภาพ และทางเคมี ที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved