บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุเกษตร

ผลมะม่วงดิบที่เก็บเกี่ยวระยะการแก่ทางการค้า 4 สายพันธุ์ ได้แก่

1. มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ (*Mangifera indica* L., cv. Chok-Anan)
2. มะม่วงพันธุ์มหาชนก (*Mangifera indica* L., cv. Maha-Chanok)
3. มะม่วงพันธุ์แก้ว (*Mangifera indica* L., cv. Kaew)
4. มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (*Mangifera indica* L., cv. Namdorkmai)

โดยซื้อมาจากร้านขายส่งผลมะม่วงในตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงกันยายน พ.ศ.2546

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี (Chroma meter Minolta® model CR-300, Japan)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 (Analytical balance, Sartorius analytic : Model A Germany)
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ThermoSpectronic “BioMate 5”, U.S.A.)
5. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectro 22 “LABOMAB”, U.S.A.)
6. เครื่อง magnetic stirrer (Whatman® model HPMS, England)
7. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge Rotina 46 R “Hettich Zentrifugen”, Germany)
8. เครื่องปั่นอาหาร (Blender “Imarflex” model IF-380, Thailand)
9. ตู้เย็นอุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส
10. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (Microprocesser pH meter “HANNA” model 213, U.S.A.)
11. เครื่อง hot plate and magnetic stirrer (Hot plate and magnetic stirrer Whatman® model HPMS, England)
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath “Gallenkamp”, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

13. กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)
14. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
15. มีดปอกและมีดหั่นผลไม้
16. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (ยี่ห้อ Brica)
17. ถาดโฟมสี่เหลี่ยมขนาด 18 x 6 x 2 เซนติเมตร
18. ฟิล์มพลาสติกใสสำหรับหุ้มอาหาร ชนิด Low-density polyethylene (LDPE)

3.3 สารเคมี

1. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride, $CaCl_2$ "เวชวิทย์" Calcium chloride, เกรดอาหาร, เอส.เค.เทรดดิ้ง, ประเทศไทย)
2. กรดซิตริก (Citric acid "เวชวิทย์" Citric acid, เกรดอาหาร, เอส.เค.เทรดดิ้ง, ประเทศไทย)
3. แคลเซียมคาร์ไบด์ (Calcium carbide, Ca_2C)
4. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate monohydrate, $NaH_2PO_4.H_2O$, "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
5. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
6. กรดอะซีติก (Acetic acid, CH_3COOH "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
7. กัวอะคอล (Guaiacol, $C_7H_8O_2$ "Fluka" AR Grade, Fluka, Switzerland)
8. ไพโรแคทิคอล (Pyrocatechol, $C_6H_6O_6$ "Fluka" HPLC Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A)
9. โซเดียมอะซีเตตแอนไฮดรัส (Sodium acetate anhydrous, CH_3COONa "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
10. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phthalate, NaH_2PO_4 "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
11. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2 "Merck" AR Grade, E. Merck, Germany)
12. โปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin "Fluka" BSA, AR Grade, Fluka, Switzerland)
13. Coomassie brilliant blue G-250 (Coomassie brilliant blue G-250 "Fluka" HPLC Grade, Sigma-Aldrich, U.S.A)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

14. กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% (*Ortho*-phosphoric acid 85% “Merck” AR Grade, E. Merck, Germany)
15. เอทานอล (Ethanol “สยามเอทานอลอุตสาหกรรม จำกัด” Food Grade, อยุธยา, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

การเตรียมผลมะม่วงสำหรับการทดลอง มีขั้นตอนดังนี้

นำผลมะม่วงดิบมาคัดให้มีขนาดของผลใกล้เคียงกัน แล้วนำมาคัดแยกระยะความอ่อน-แก่ โดยใช้ความถ่วงจำเพาะ คือคัดเลือกผลมะม่วงที่จมในน้ำเกลือความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์และลอยในน้ำเกลือความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นดัชนีในการคัดเลือกระยะความแก่ของผลมะม่วง แล้วนำมาล้างน้ำสะอาด 2 ครั้ง ผึ่งให้ผิวของผลมะม่วงแห้ง บ่มมะม่วงในกล่องกระดาษกล่องละประมาณ 15 ผล โดยใช้ปริมาณแคลเซียมคาร์ไบด์ 3 กรัมต่อผลมะม่วง 1 กิโลกรัม จนผลสุกเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองมากกว่า 80% (จักรกฤษณ์, 2546)

การทดลองแต่ละขั้นตอน ใช้หน่วยการทดลอง คือ ผลมะม่วงสุก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โชคอนันต์ พันธุ์มหาชนก พันธุ์แก้ว และพันธุ์น้ำดอกไม้

วิธีการทดลองงานวิจัยนี้แบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส และสมบัติทางกายภาพและเคมี ในเนื้อมะม่วงสุก 4 สายพันธุ์

กำหนดสิ่งทดลองคือความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และเวลาที่ใช้ในการแช่เป็นปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยกำหนดปัจจัยของการศึกษาได้ดังนี้

- สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์) = 2, 3 หรือ 4 (McEvily *et al*.,1992)
- ระยะเวลาที่แช่ในสารละลาย (นาที) = 1, 2 หรือ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลองของตอนที่ 1

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำผลมะม่วงสุกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากการบ่มในขั้นตอนของการเตรียมผลมะม่วงสำหรับการทดลอง (ทำครั้งละ 1 สายพันธุ์) นำผลมะม่วงสุกมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำมาปอกเปลือก หั่นและตัดแต่งเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1.5 x 1.5 x 1.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ตามสภาวะความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่ที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ปล่อยให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาบรรจุในถาดโฟมขนาด 18 x 6 x 2 เซนติเมตร ถาดละ 10 ชิ้นแล้วหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกยืดใสชนิด low-density polyethylene ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะใช้ผลมะม่วงสุก 2 ผล นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยสุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงสุกออกมาเพื่อวิเคราะห์ผลทุกๆ 2 วัน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง เริ่มจากวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ตามลำดับ โดยจะทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ คือวัดสีของชิ้นเนื้อมะม่วง วิเคราะห์สมบัติทางเคมี คือวัดค่าพีเอช และกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส แล้วนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ ว่าชุดการทดลองใดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด (รูปที่ 3.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 ชุดการทดลองที่ใช้ในการทดลองของตอนที่ 1

ชุดการทดลองที่	สภาวะการทดลอง
ชุดควบคุม	เนื้อมะม่วงสุกที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์
1	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
2	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
3	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที
4	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
5	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
6	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที
7	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
8	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
9	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนในการทดลองตอนที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของสารละลายกรดซิตริกที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสมบัติทางกายภาพ และเคมี ในเนื้อมะม่วงสุก 4 สายพันธุ์

กำหนดสิ่งทดลองคือความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกและเวลาที่ใช้ในการแช่เป็นปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยกำหนดปัจจัยของการศึกษาได้ดังนี้

- สารละลายกรดซิตริก (เปอร์เซ็นต์) = 1, 1.5 หรือ 2 (McEvily *et al*.,1992)
- ระยะเวลาที่แช่ในสารละลาย (นาที) = 1, 2 หรือ 3

วิธีการทดลองของตอนที่ 2

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำผลมะม่วงสุกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากการบ่มในขั้นตอนของการเตรียมผลมะม่วงสำหรับการทดลอง (ทำครั้งละ 1 สายพันธุ์) โดยนำผลมะม่วงสุกมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำมาปอกเปลือก หั่นและตัดแต่งเป็นชิ้นขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในสารละลายกรดซิตริกตามสภาวะความเข้มข้นและเวลาในการแช่ที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลองดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 ปล่อยให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาบรรจุในถาดโฟมขนาด 18 x 6 x 2 เซนติเมตร ถาดละ 10 ชิ้น แล้วหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกยืดใสชนิด low-density polyethylene ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะใช้ผลมะม่วงสุก 2 ผล นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 10 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยสุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงสุกออกมาเพื่อวิเคราะห์ผลทุกๆ 2 วัน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง เริ่มจากวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ตามลำดับ โดยจะทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ คือวัดสีของชิ้นเนื้อมะม่วง วิเคราะห์สมบัติทางเคมีคือวัดค่าพีเอช และกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส แล้วนำผลค่ากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติว่าชุดการทดลองใดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด (รูปที่ 3.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 ชุดการทดลองที่ใช้ในการทดลองของตอนที่ 2

ชุดการทดลองที่	สภาวะการทดลอง
ชุดควบคุม	เนื้อมะม่วงสุกที่ไม่ได้ผ่านการแช่สารละลายกรดซิตริก
1	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
2	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
3	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที
4	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
5	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
6	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที
7	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที
8	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
9	เนื้อมะม่วงสุกที่แช่ในสารละลายกรดซิตริก 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนในการทดลองตอนที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

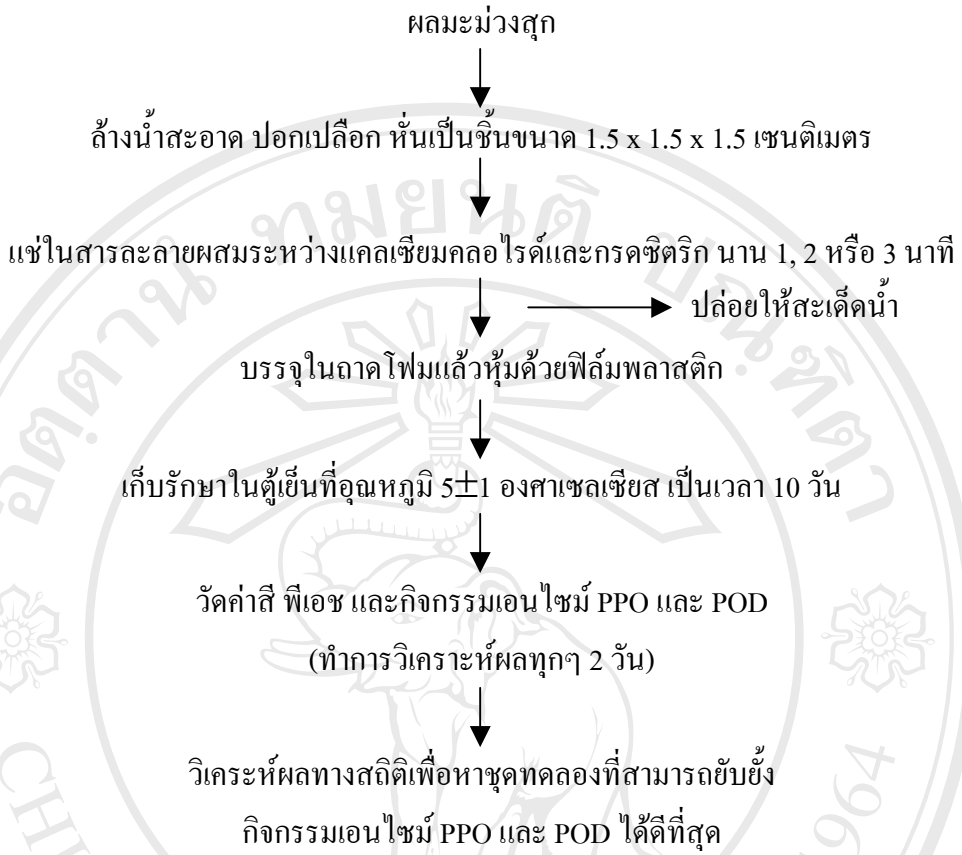
ตอนที่ 3 ศึกษาผลของสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และกรดซิตริกต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส และสมบัติทางกายภาพและเคมี ในเนื้อมะม่วงสุก 4 สายพันธุ์

กำหนดสิ่งทดลอง คือ ความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์และกรดซิตริกที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด ระดับความเข้มข้นของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ได้มาจากการทดลองตอนที่ 1 และ 2 โดยใช้ระยะเวลาที่แช่ในสารละลาย 3 ระดับ คือ 1, 2 และ 3 นาที

วิธีการทดลองของตอนที่ 3

ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยนำผลมะม่วงสุกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากการบ่มในขั้นตอนของการเตรียมผลมะม่วงสำหรับการทดลอง (ทำครั้งละ 1 สายพันธุ์) โดยนำผลมะม่วงสุกมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำมาปอกเปลือก หั่นและตัดแต่งเป็นชิ้นขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 เซนติเมตร แล้วแช่ในสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และกรดซิตริกตามสภาวะความเข้มข้นของชุดการทดลองที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด จากผลการทดลองของตอนที่ 1 และ2 ในระยะเวลาที่กำหนดไว้คือ 1, 2 หรือ 3 นาที ตามลำดับ ปล่อยให้สะเด็ดน้ำแล้วนำมาบรรจุในถาดโฟมขนาด 18 x 6 x 2 เซนติเมตร ถาดละ 10 ชิ้น แล้วหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกยืดใสชนิด low-density polyethylene (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะใช้ผลมะม่วงสุก 2 ผล เตรียมตัวอย่างทั้งหมด 30 ถาด) นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 10 วันนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 10 วัน หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์ผลโดยสุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อมะม่วงสุกออกมาเพื่อวิเคราะห์ผลทุกๆ 2 วัน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง เริ่มจากวันที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ตามลำดับ โดยจะทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพคือวัดสีของชิ้นเนื้อมะม่วง วิเคราะห์สมบัติทางเคมีคือวัดค่าพีเอช และกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสแล้วนำผลนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติว่าชุดการทดลองใดสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่สุด (รูปที่ 3.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนในการทดลองตอนที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

เอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส หรืออาจเรียกว่า ไทโรซิเนส (tyrosinase) ออโทไดฟีนอลออกซิเดส (*o*-diphenol oxidase) และแคตีคอลออกซิเดส (catechol oxidase) เป็นต้น เป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อของผลไม้บางชนิด เช่น มะม่วง เมื่อผลไม้เกิดบาดแผลหรือผ่านกระบวนการแปรรูปต่างๆ เช่น การปอกเปลือกหรือหั่นชิ้น จะทำให้สารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในเซลล์ของเนื้อผลไม้สัมผัสกับออกซิเจนในอากาศเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานี้ ทำให้เกิดเป็นสารสีน้ำตาล สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรได้ โดยสภาพพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสคือ 4-7 (Severini *et al.,* 2003)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโตรีดักเตส มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของสีและรสชาติของผักหรือผลไม้ และเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในผลไม้หลายชนิด โดยการเกิดสีน้ำตาลมักจะเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลที่เป็นสับสเทรตกลายเป็นออโท-ควิโนน แล้วรวมตัวกันกลายเป็นสารสีน้ำตาล โดยปฏิกิริยาหลักของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคือ peroxidatic reaction ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่จะใช้ guaiacol assay เนื่องจากไม่ซับซ้อน สามารถเตรียมได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้โดยตรงและต่อเนื่อง มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density, OD) สูงสุดที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยสภาพพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคือ 5.5-7.5 (Robinson, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.1 วิธีการสกัดเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธีของ de Oliveria Lima *et al*., (1999)

นำเนื้อมะม่วงสุกปั่นละเอียดมา 1 กรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็นจัด แล้วเติมสารละลายสกัดเอนไซม์ ได้แก่ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดเนื้อมะม่วงกับสารละลายสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกันนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้ส่วนใสที่สกัดได้ (supernatant) เป็นส่วนที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส

3.5.2 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสโดยวิธีของ Flurkey และ Jen (1978)

ปิเปตส่วนใสที่สกัดได้ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายสับสเทรต ซึ่งประกอบด้วยสารละลายแคตีคอล ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์พีเอช 6.5 ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง(optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.5 แล้วคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส มีหน่วยเป็นหน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยวิธีของ Flurkey และ Jen (1978)

ปิเปตส่วนใสที่สกัดได้ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายสับสเทรต ซึ่งประกอบด้วย สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 2.40 มิลลิลิตร (ซึ่งประกอบด้วย guaiacol ความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.1%) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (specific activity) มีหน่วยเป็น หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน/ นาที

3.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding โดยวิธีของ Bradford (1976)

3.5.4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ใช้โปรตีนอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายปริมาตร 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie brilliant blue (0.05% Coomassie brilliant blue G—250 ใน 5% ethanol และ 10% phosphoric acid) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้มาเขียนเส้นกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่สกัดได้จากการสกัดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดทดลองหลอดละ 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie brilliant blue (0.05% Coomassie brilliant blue G—250 ใน 5% ethanol และ 10% phosphoric acid) หลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายอยู่ในสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่สกัดได้

วิธีการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส

ก) กิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง มาคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 จะได้กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้}}{0.001} = \text{A หน่วย/นาที (Flurkey and Jen, 1978)}$$

- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร (250 ไมโครลิตร) มีกิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ A หน่วย/นาที
- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ A x 4 หน่วย = B หน่วย/นาที/มิลลิลิตร
- แสดงว่า สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ มีกิจกรรมเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ B หน่วย/นาที/มิลลิลิตร----------(1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากช่วงของกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง มาคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วยเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ

$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้}}{0.001} = \text{C หน่วย/นาที (Flurkey and Jen, 1978)}$$

- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 ไมโครลิตร) มีกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ C หน่วย/นาที
- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะมีกิจกรรมเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดสเท่ากับ C x 10 หน่วย = D หน่วย/นาที/มิลลิลิตร
- แสดงว่า สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ มีกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเท่ากับ D หน่วย/นาที/มิลลิลิตร----------(2)

ค) วิธีการคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ไปเปรียบเทียบหาปริมาณของโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน ดังรูปที่ 3.4

- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่ากับ E ไมโครกรัม
- สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่ากับ E/200 ไมโครกรัม = F ไมโครกรัม
- แสดงว่า สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ มีความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่ากับ F ไมโครกรัม/ไมโครลิตร หรือเท่ากับ F มิลลิกรัม/มิลลิลิตร----------(3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ง) วิธีการคำนวณหา specific activity ของเอนไซม์

specific activity ของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

$$= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส}}{\text{ปริมาณของโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}} = \frac{\text{สมการ (2)}}{\text{สมการ (3)}}$$

specific activity ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

$$= \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส}}{\text{ปริมาณของโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}} = \frac{\text{สมการ (1)}}{\text{สมการ (3)}}$$

* specific activity ของเอนไซม์มีหน่วยเป็น หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

จ) วิธีการคำนวณการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

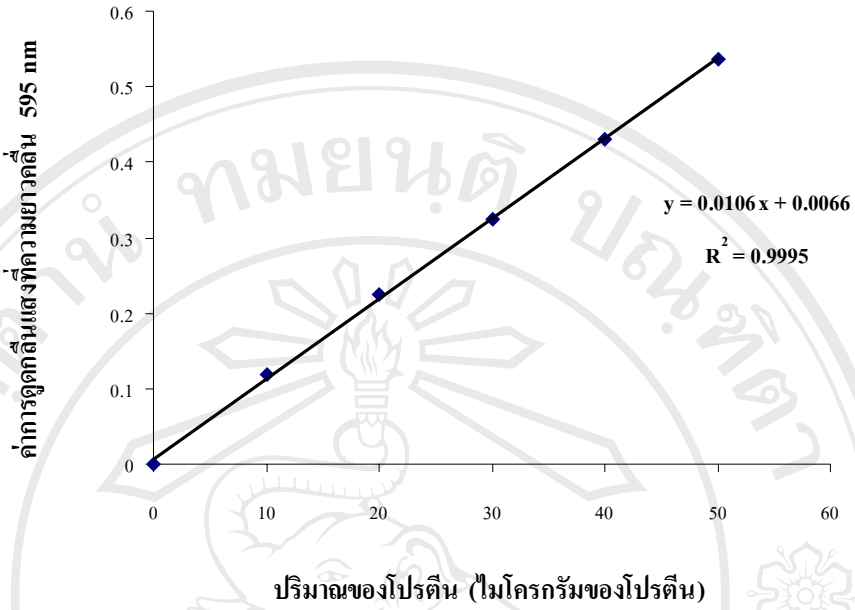
การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส (เปอร์เซ็นต์)

$$= \left[\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส (ชุดการทดลอง)}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส (ชุดควบคุม)}} \text{ X } 100 \right] - 100$$

การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (เปอร์เซ็นต์)

$$= \left[\frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ชุดการทดลอง)}}{\text{กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ชุดควบคุม)}} \text{ X } 100 \right] - 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 3.4 กราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.6 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.6.1 การวัดสีโดยใช้เครื่อง Chroma Meter ระบบ CIELAB (L*, a*, b*) (Minolta, 1994)

วัดการเปลี่ยนแปลงของสีเนื้อมะม่วงสุก แต่ละชิ้นโดยวัดชิ้นละ 3 ตำแหน่ง ค่าที่ได้จะแสดงเป็น L*, a*, b* โดยกำหนด

ค่า L* คือ ค่าความสว่าง (Lightness) มีค่าอยู่ในช่วง 0-100
สีขาว (L*=100) สีดำ (L*=0)

ค่า a* คือ ค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greeness)
สีแดงเมื่อ a* มีค่าเป็นบวก (+), สีเขียวเมื่อ a* มีค่าเป็นลบ (-)

ค่า b* คือ เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)
สีเหลืองเมื่อ b* มีค่าเป็นบวก (+), สีน้ำเงินเมื่อ b* มีค่าเป็นลบ (-)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำค่า a* และ b* มาหาค่า Hue angle และ Chroma จากสูตร

$$\text{Chroma } (C^*) = \sqrt{(a^{*2}) + (b^{*2})}$$

$$\text{Hue angle } (H^\circ) = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

ถ้า C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)

ถ้า C* มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

ถ้า H° มีค่าเข้าใกล้ศูนย์องศา หมายถึง วัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีแดง

ถ้า H° มีค่าเข้าใกล้ 90 องศา หมายถึง วัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง

ถ้า H° มีค่าเข้าใกล้ 180 องศา หมายถึง วัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว

3.7 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.7.1 การวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดด้วยเครื่องวัดพีเอช (Microprocesser pH meter "HANNA" model 213, USA)

ชั่งเนื้อมะม่วงสุกปั่นเป็นเนื้อเดียวกันมาประมาณ 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน แล้ววัดพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอชที่มีการตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องพีเอชมิเตอร์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.01 และ 7.00 ตามลำดับ จดบันทึกผล

3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองของตอนที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็นผลของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ กรดซิตริก และสารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคลอไรด์และกรดซิตริกต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและพอลีฟีนอลออกซิเดสในเนื้อมะม่วงสุกทั้ง 4 สายพันธุ์ ในระหว่างการเก็บรักษามาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความผันแปร เมื่อพบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (ตอนที่ 1 และ 2) และ Least Significant Different (LSD) (ตอนที่ 3)โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.10 (อิศรพงษ์, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved