บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

กล้วยน้ำว้า [*Musa* (ABB group) 'Kluai Nam Wa']

ซื้อจากตลาดเมืองทองธานี จังหวัดนนทบุรี กล้วยที่นำมาใช้ในการทดลองเมื่อยังไม่ได้ปอกเปลือกจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3.3-3.6 ซม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.5±0.1 ซม. (วัด 5 ซ้ำ) และมีความยาวอยู่ในช่วง 9.5-10.8 ซม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.2±0.5 ซม. (วัด 5 ซ้ำ) เมื่อปอกเปลือกแล้ว กล้วยจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3.0-3.3 ซม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.2±0.1 ซม. (วัด 5 ซ้ำ) และมีความยาวอยู่ในช่วง 9.3-10.5 ซม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.9±0.5 ซม. (วัด 5 ซ้ำ) โดยในทุกครั้งจะซื้อกล้วยน้ำว้าตั้งแต่ยังดิบ ซึ่งมีระยะการสุกที่ 1 (PCI 1) ตามดัชนีสีเปลือกคือ เปลือกมีสีเขียวทั้งผล ผลแข็ง นำกล้วยมาตัดแบ่งเป็นหวี แล้วนำมาบรรจุลงในกล่องกระดาษ นำกระดาษมาปิดคลุม เพื่อให้กล้วยแต่ละหวีมีสีเปลือกและความสุกสม่ำเสมอกัน เก็บที่อุณหภูมิ 30 °C ปล่อยให้กล้วยสุกถึงระยะการสุกตามต้องการ โดยสังเกตจากลักษณะของสีเปลือกตามที่ดัชนีสีเปลือกกำหนดไว้ แล้วจึงสุ่มตัวอย่างโดยคละหวี คละลูก เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

น้ำสับปะรด

น้ำสับปะรดที่ใช้ในการทดลอง เป็นน้ำสับปะรดบรรจุกระป๋อง ตรามาลี บริษัทมาลีสามพราน จำกัด (มหาชน) ส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำสับปะรด 100 % ไม่ผสมน้ำตาล ไม่ใช้วัตถุกันเสีย และสีสังเคราะห์ โดยมีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 0.01% (0.12 mg/ml) pH 3.8±0.0 (วัด 3 ซ้ำ) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 13.1±0.1 °Brix (วัด 3 ซ้ำ)

น้ำผึ้ง

เป็นน้ำผึ้งของโครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ซึ่งรับซื้อน้ำผึ้งจากสหกรณ์ผู้เลี้ยงผึ้งภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่ แล้วนำมาบรรจุขวดและหลอดเพื่อจัดจำหน่าย โดยเป็นน้ำผึ้งที่ได้จากเกสรของดอกลำไย ซึ่งจะมีกลิ่นหอม รสชาติดี เป็นที่นิยมของตลาด มีส่วนประกอบได้แก่ น้ำผึ้ง 100 % โดยมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ 81.0±0.1 °Brix (วัด 3 ซ้ำ)

3.1.2 สารเคมี

Ammonium sulphate	A.R. grade (Fluka)
L–ascorbic acid	A.R. grade (Sigma)
L–ascorbic acid	Food grade
Bovin serum albumin	A.R. grade (Sigma)
Catechol	A.R. grade (Merck)
Celite	A.R. grade (Fluka)
Citric acid	A.R. grade (Fluka)
Citric acid	Food grade
Copper sulphate pentahydrate	A.R. grade (Merck)
Diethyl ether	A.R. grade (APS)
Disodium hydrogen phosphate	A.R. grade (Merck)
Ethyl alcohol absolute	A.R. grade (CarLo ERBA)
Folin–Ciocalteu phenol reagent	A.R. grade (Merck)
Hydrochloric acid	A.R. grade (Fluka)
5-Hydroxymethylfurfural	A.R. grade (Fluka)
Methylene blue	A.R. grade (Merck)
Phenolphthalein	A.R. grade (Merck)
Potassium chloride	A.R. grade (Sigma)
Potassium hydrogen phtalate	A.R. grade (Merck)
Potassium metabisulphite	A.R. grade (Merck)
Potassium sodium tartrate	A.R. grade (Merck)
Resorcinol	A.R. grade (CarLo ERBA)
Sodium acetate	A.R. grade (Merck)
Sodium carbonate	A.R. grade (Merck)
Sodium deoxycholate	A.R. grade (Fluka)
Sodium dihydrogen phosphate	A.R. grade (Merck)
Sodium dodecyl sulphate	A.R. grade (Sigma)
Sodium hydroxide	A.R. grade (Sigma)
Sodium metabisulphite	A.R. grade (Merck)
Trichloroacetic acid	A.R. grade (Fluka)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Plate count agar	A.R. grade (Merck)
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Potato dextrose agar	A.R. grade (Merck)

3.1.3 อุปกรณ์

Hand refractometer (รุ่น 2110–W06 บริษัท Atago, Japan)

pH meter (รุ่น F-21 บริษัท Horiba, Japan)

Refrigerated centrifuge (รุ่น multi–RF บริษัท Thermo IEC, USA)

Spectrophotometer (รุ่น Genesys-10 UV บริษัท Thermo Spectronic, USA)

Spectrophotometer (รุ่น Lambda 25 บริษัท Perkin Elmer, USA)

Tray dryer (รุ่น TFC-900 บริษัท Kobishi, Japan)

Texture analyzer (รุ่น TA–XT2I บริษัท Texture Technologies Corporation, USA)

เครื่องชั่งน้ำหนัก (รุ่น 3100s บริษัท Sartorius, Germany)

เครื่องวัดสี (รุ่น CR–300 บริษัท Minolta, Japan)

ตู้อบหาความชื้น (รุ่น 600 บริษัท Memmert, USA)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 กำหนดระยะการสุกของกล้วยน้ำว้าตามดัชนีสีเปลือก (peel colour index, PCI)

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการแบ่งระยะการสุกของกล้วยน้ำว้าให้สัมพันธ์กับดัชนีสีเปลือก ซึ่งจะทำให้เห็นภาพระยะการสุกของกล้วยน้ำว้าได้ชัดเจน และใช้เป็นมาตรฐานในการระบุ PCI ของกล้วยน้ำว้าที่ใช้ในการทดลอง โดยนำกล้วยน้ำว้าดิบบรรจุในกล่องกระดาษแล้วนำกระดาษมาปิดคลุม เก็บที่อุณหภูมิ 30 °C ทำการถ่ายรูปกล้วยในแต่ละระยะการสุกให้ตรงตามที่ดัชนีสีเปลือกได้กำหนดไว้ โดยเริ่มถ่ายตั้งแต่กล้วยดิบจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นกล้วยสุกเต็มที่ ซึ่งดัชนีสีเปลือกของกล้วยได้แบ่งระยะการสุกของกล้วยเป็น 8 ระยะ (CRISO, 1972) ดังนี้

ระยะที่1 เปลือกเขียว ผลแข็ง ไม่มีการสุก

ระยะที่ 2 เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวออกเหลืองนิดๆ

ระยะที่ 3 เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวออกเหลืองมากขึ้น แต่ยังมีสีเขียวมากกว่าเหลือง

ระยะที่ 4 เริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวออกเหลืองมากขึ้น และมีสีเหลืองมากกว่าเขียว

ระยะที่ 5 เปลือกเป็นสีเหลืองแต่ปลายยังเป็นสีเขียว

ระยะที่ 6 ทั้งผลมีสีเหลือง (ผลสุก)

ระยะที่ 7 ผิวสีเหลืองและเริ่มมีจุดน้ำตาล (สุกเต็มที่ มีกลิ่นหอม)

ระยะที่ 8 ผิวสีเหลืองและเริ่มมีจุดน้ำตาลมากขึ้น (สุกมากเกินไป เนื้อเริ่มอ่อนตัวและมีกลิ่นแรง)

3.2.2 ตรวจวัดสมบัติทางเคมีและกายภาพของกล้วยน้ำว้า

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าสีเปลือกในแต่ละระยะการสุกกับสมบัติทางเคมีและกายภาพของกล้วยน้ำว้า และเพื่อดูแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีและกายภาพเมื่อกล้วยเปลี่ยนจากผลดิบเป็นสุก ในการทดลองนี้จะแปรระยะการสุกของกล้วยน้ำว้าเป็น 6 ระยะ คือ PCI 2 – 7 โดยใช้ PCI เป็นเกณฑ์ (CRISO, 1972) โดยนำกล้วยที่มี PCI 2 - 7 มาตรวจวัดสมบัติดังต่อไปนี้

3.2.2.1 ค่าสีเปลือก

ใช้การวัดค่าสีในระบบ CIE L*,a*,b* ด้วยเครื่องวัดสี Minolta รุ่น CR-300 โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 เนื่องจากเมื่อกล้วยเริ่มสุก สีของเปลือกกล้วยจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองที่บริเวณกลางผลเป็นแนวตามยาวก่อนบริเวณอื่น จึงวัดสีที่ตำแหน่งกลางผล โดยในหนึ่งลูกจะวัด 3 จุดเรียงตามแนวยาวของผล วัด 3 ลูก ถือเป็น 1 ซ้ำ

3.2.2.2 ความแน่นแข็งของเนื้อกล้วยน้ำว้า

ใช้การวัดค่าความแน่นแข็ง (firmness) ด้วยเครื่อง Texture analyzer (รุ่น TX-XT2I บริษัท Texture Technologies Corporation, USA) โดยใช้หัวเจาะ p2 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm. มีหน่วยเป็นกรัม (g) โดยนำกล้วยมาปอกเปลือก แล้ววัดค่าความแน่นแข็ง 3 จุด ใน 1 ลูก วัดค่า 3 ลูก ถือเป็น 1 ซ้ำ รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ก.1

3.2.2.3 ปริมาณความชื้น

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1995)

3.2.2.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นำกล้วยมาบดด้วย blender ให้ละเอียด เทใส่บีกเกอร์ขนาด 100 ml แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง โดยใช้ pH meter

3.2.2.5 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ทั้งหมด ในรูปกรดซิตริก

ใช้การไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ตามวิธีการของ A.O.A.C. (1995) แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ในรูปของกรดซิตริก (โดยในการคำนวณกำหนดให้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 ml ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดซิตริก 6.4 mg)

3.2.2.6 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solids, TSS)

นำกล้วยมาบดด้วย blender ให้ละเอียด แล้วนำมาบีบน้ำออกด้วยผ้าขาวบาง ใช้การวัดด้วย hand refractometer

3.2.2.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Lane – Eynon (ภาคผนวก ก.2)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS) เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้วยตาก

เนื่องจากคุณภาพของกล้วยน้ำว้าที่นำมาอบแห้งและอุณหภูมิในการอบแห้ง อาจส่งผลทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์กล้วยตากที่ได้ทั้งในด้านสี เนื้อสัมผัส และกลิ่นรสแตกต่างกัน ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาระยะการสุกของกล้วยน้ำว้า และอุณหภูมิในการอบแห้งที่เหมาะสม โดยแปรระยะการสุกของกล้วยเป็น 3 ระดับคือ PCI 5 6 และ 7 และแปรอุณหภูมิในการอบแห้งเป็น 3 ระดับคือ 60 °C 65 °C และ 70 °C โดยนำกล้วยมาปอกเปลือก ลอกเส้นใยออก แล้วหั่นเป็นแว่นหนาประมาณ 2 cm. โดยตัดส่วนปลายทั้งสองข้างของผลกล้วยทิ้ง เนื่องจากส่วนปลายผลกล้วยจะมีลักษณะเรียวเล็กกว่าบริเวณตรงกลางผล ซึ่งจะทำให้ได้ชิ้นกล้วยตากที่มีขนาดและลักษณะไม่สม่ำเสมอกัน จากนั้นทำการอบแห้งด้วยเครื่อง tray dryer (เครื่องอบแห้งแบบถาด) (โดยไม่มีขั้นตอนการลวกกล้วยหลังจากหั่น เนื่องมาจากกล้วยที่ใช้ในการทดลองเป็นกล้วยสุก ซึ่งมีเนื้อสัมผัสที่นิ่มและมีกลิ่นหอม การลวกจึงอาจส่งผลกระทบต่อเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของกล้วย โดยอาจทำให้เนื้อสัมผัสนิ่ม เละ เกินไป และกลิ่นรสเปลี่ยนแปลงไป) เมื่อสังเกตดูบริเวณผิวหน้าตัดของกล้วยที่หั่นแว่น จะเห็นว่าตรงบริเวณแกนกลางของกล้วย (บริเวณไส้) จะเป็นบริเวณที่เห็นสีน้ำตาลดำคล้ำได้ชัดเจน อีกทั้งหลังจากทำแห้งแล้วก็อาจเห็นสีน้ำตาลดำคล้ำเด่นชัดยิ่งขึ้น ทำให้ไม่น่าบริโภค ดังนั้นเมื่ออบแห้งครบ 8 ชม.แล้ว จึงนำกล้วยออกมาทับด้วยแรง1 kg. เพื่อให้เห็นแต่ผิวรอบนอกของกล้วย แล้วนำมาใส่ถุง polyethylene พักไว้ 1 คืน เพื่อให้ความชื้นจากภายในชิ้นกล้วยเคลื่อนที่ออกมาสู่บริเวณผิวนอก ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเยิ้มบริเวณผิว และทำให้กล้วยแต่ละชิ้นมีความชื้นสม่ำเสมอกัน แล้วจึงอบแห้งต่อจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีค่าความชื้นไม่เกิน 21% ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์กล้วยอบ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2528) และมีค่า Aw ไม่เกิน 0.65 เนื่องจากจะช่วยลดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ยีสต์และราได้ (Phoungchandang และ Woods, 2000) หาเวลาที่ใช้ในการทำแห้งจนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นและค่า Aw ที่ต้องการได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปกับเวลาในการอบแห้ง และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Aw ที่เปลี่ยนแปลงไปกับเวลาในการอบแห้ง ขั้นตอนการทดลองแสดงดังแผนภาพ รูปที่ 3.1 จากนั้นจึงอบแห้งกล้วยตามเวลาที่ได้และประเมินคุณภาพของกล้วยตากที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์กล้วยตากทางการค้า ดังนี้

3.2.3.1 ปริมาณความชื้น ตามข้อ 3.2.2.3

3.2.3.2 Aw

ใช้เครื่อง Aw-value analyzer

3.2.3.3 ค่าสี

ใช้การวัดค่าสีในระบบ CIE L*,a*,b* ด้วยเครื่องวัดสี Minolta รุ่น CR-300 โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 เนื่องจากกล้วยตากที่ผลิตได้จะมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและค่อนข้างแบนเล็กน้อย กว้าง 1.6±0.1 cm. ยาว 2.5±0.1 cm. และหนา 1.4±0.1 cm. (วัด 3 ซ้ำ) จึงวัดสีที่บริเวณผิวรอบนอก (ไม่วัดบริเวณไส้) โดยวัดชิ้นละ 2 จุด วัด 3 ชิ้นถือเป็น 1 ซ้ำ

3.2.3.4 เนื้อสัมผัส

ใช้การวัดค่าแรงตัดขาด (cutting force) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกความนิ่มหรือความแข็งของผลิตภัณฑ์ โดยใช้เครื่อง Texture analyzer โดยใช้หัวตัด (HDP/BSK Blade set with knife) ตัดตามความยาวของชิ้นกล้วยตาก มีหน่วยเป็นนิวตัน (N) รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ก.3

วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 3 x 3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.3.5 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ใช้แบบทดสอบชนิด Hedonic score 9 ระดับ ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ประเมินความชอบทางด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม (ตัวอย่างแบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ข)

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

คัดเลือกระยะการสุกของกล้วยและอุณหภูมิในการทำแห้งกล้วยที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าสีและเนื้อสัมผัสของกล้วยตาก ร่วมกับคะแนนความชอบทางด้านประสาทสัมผัส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

กล้วยน้ำว้าที่ระยะการสุกต่างๆ (PCI 5 6 และ 7)

↓

ปอกเปลือก ลอกเยื่อกล้วยออก หั่นเป็นแว่นหนา 2 cm.

↓

อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C 65 °C และ 70 °C

(เมื่ออบครบ 8 ชม. นำกล้วยออกมาทับด้วยแรง 1 kg. แล้วนำมาใส่ถุง polyethylene พักไว้ 1 คืน แล้วจึงอบต่อที่อุณหภูมิเดิมจนครบ 16 ชม.)

↓

สุ่มตัวอย่างทุกชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและค่า Aw

↓

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นและค่า Aw ที่เปลี่ยนแปลงไป กับเวลาในการอบแห้งโดยวิธี multiple regression ในรูปของสมการกำลังสอง

↓

คำนวณหาเวลาในการอบแห้งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณความชื้น ไม่เกิน 21 % และมีค่า Aw ไม่เกิน 0.65 จากสมการ

↓

อบกล้วยตามเวลาที่ได้ และประเมินคุณภาพด้านสีและเนื้อสัมผัสของกล้วยตาก ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกล้วยตากทางการค้า และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสกล้วยตากที่ได้จากการทดลอง

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนในการทำกล้วยน้ำว้าอบแห้งเพื่อเลือกภาวะการอบแห้งที่เหมาะสม

3.2.4 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) ในกล้วยน้ำว้า และศึกษาผลของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PPO

ในขั้นตอนการปอกและหั่นกล้วยเพื่อเตรียมเป็นวัตถุดิบ จะสังเกตเห็นว่ากล้วยจะเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ซึ่งการเกิดสีน้ำตาลคล้ำของกล้วยในขั้นตอนนี้เกิดเนื่องจากเอนไซม์ PPO ซึ่ง PPO ในผักผลไม้แต่ละชนิดจะมีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงทำให้วิธีการหรือชนิดของสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลแตกต่างกันด้วย ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) ในกล้วยน้ำว้า และศึกษาผลของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการหาวิธีป้องกันการเกิดสีน้ำตาลเนื่องจาก PPO ในกล้วย โดยนำกล้วยน้ำว้าที่มีระยะการสุกตามที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาใช้ศึกษา ดังนี้

3.2.4.1 กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO activity)

3.2.4.1.1 เตรียม crude enzyme (ภาคผนวก ก.4)

3.2.4.1.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme

ใช้การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry (Peterson, 1977) (ภาคผนวก ก.5)

3.2.4.1.3 วิเคราะห์ PPO activity

ใช้การวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการของ Duangmal และ Owusu-Apenten (1999) โดยนำ crude enzyme 200 µl มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.0 จำนวน 2.80 ml ที่อุณหภูมิ 25 °C วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Perkin Elmer รุ่น Lambda 25) ชนิดที่มี water bath ควบคุมอุณหภูมิของ cuvette holder คำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นจากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลา คำนวณ PPO activity โดยให้เอนไซม์ 1 หน่วย (unit) เท่ากับการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง 0.001 ต่อนาที รายงาน PPO activity ที่ได้ในรูปของ units/mg protein

3.2.4.2 ศึกษาสมบัติของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

เตรียม crude enzyme (ภาคผนวก ก.4) ก่อนนำมาศึกษาสมบัติในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.2.4.2.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ crude enzyme และ substrate

นำ crude enzyme (แปรปริมาณเป็น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 µl) มาทำปฏิกิริยากับ substrate (สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 M pH 7.0) จำนวน 2.95, 2.90, 2.85, 2.80, 2.75 และ 2.70 ml ตามลำดับ เพื่อให้ reaction mixture มีปริมาตร 3 ml ที่อุณหภูมิ 25 °C วิเคราะห์ PPO activity ตามข้อ 3.2.4.1.3 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง PPO activity (units) กับปริมาณ crude enzyme ที่ใช้

3.2.4.2.2 ศึกษา optimum pH ของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

นำ crude enzyme จำนวน 200 µl มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย

catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0 – 9.0 (โดยแปรค่า pH เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0) จำนวน 2.80 ml (วิธีการเตรียมบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0 – 9.0 แสดงดังภาคผนวก ก.6) ที่อุณหภูมิ 25 °C วิเคราะห์ PPO activity ตามข้อ 3.2.4.1.3 คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละ pH ในรูปของ % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงสุดเป็น 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % relative activity ของ PPO activity ในกล้วยน้ำว้ากับค่า pH ที่ระดับต่าง ๆ เลือกค่า pH ที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปใช้ในการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.2.4.2.3 ศึกษา pH stability ของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0 - 9.0 (โดยแปรค่าpH เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0) นำ crude enzyme มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ จำนวน 200 µl มาวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.4.1.3 ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ 3.2.4.2.2 จำนวน 2.80 ml เป็น substrate เปรียบเทียบกับ crude enzyme ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 อัตราส่วน 1 ต่อ 4 ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม (control) คำนวณ PPO activity แต่ละค่า pH ในรูปของ % residual activity โดยให้ PPO activity ที่วิเคราะห์ได้จาก control มี % residual activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % residual activity ของ PPO activity กับค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบ่ม crude enzyme

3.2.4.2.4 ศึกษา optimum temperature ของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

นำ crude enzyme จำนวน 200 µl มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.2.4.2.2 จำนวน 2.80 ml วิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.4.1.3 โดยแปรอุณหภูมิเป็น 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 °C ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้ water bath ซึ่งต่อเชื่อมกับ cuvette holder (โดยนำ substrate มาบ่มใน water bath ให้ได้อุณหภูมิตามที่ต้องการศึกษาก่อน แล้วจึงนำ crude enzyme มาทำปฏิกิริยา) คำนวณ PPO activity ที่ได้ในแต่ละอุณหภูมิเป็น % relative activity โดยให้ PPO activity ที่มีค่าสูงที่สุดมี relative activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง relative activity กับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เลือกระดับอุณหภูมิที่ให้ PPO activity สูงที่สุดไปศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.2.4.2.5 ศึกษา temperature stability ของ crude PPO ในกล้วยน้ำว้า

นำ crude enzyme มาบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำให้เย็นทันทีใน ice bath ก่อนนำ crude enzyme ที่บ่มเสร็จแล้วจำนวน 200 µl มาวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.4.1.3 โดยใช้สารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ที่เลือกไว้ในข้อ 3.2.4.2.2 จำนวน 2.80 ml ที่อุณหภูมิที่เลือกไว้ในข้อ 3.2.4.2.4 เปรียบเทียบกับ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม นำ PPO activity ที่ตรวจสอบได้มาคำนวณเป็น % residual activity โดยให้ PPO activity ใน crude enzyme ที่ไม่ผ่านการบ่มมี residual activity เท่ากับ 100%

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง residual activity กับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม crude enzyme

3.2.4.2.6 ศึกษาผลของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลต่อ PPO activity

สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลที่ใช้ศึกษา ได้แก่

- กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.5% 1% 1.5% (w/v)
- สารผสมระหว่างกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.5% (w/v) กับกรดซิตริกความเข้มข้น 0.5% (w/v)
- สารผสมระหว่างกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.5% (w/v) กับน้ำสับปะรด 100%
- สารผสมระหว่างกรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 0.5% (w/v) กับน้ำผึ้ง (ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 64-66%)
- โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.1% (w/v)

นำสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลชนิดต่างๆ 0.2 ml มาผสมกับสารละลาย catechol ความเข้มข้น 20 mM ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ตามที่เลือกไว้ในข้อ 3.2.4.2.2 จำนวน 2.60 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำ crude enzyme จำนวน 200 µl มาทำปฏิกิริยากับสารผสมดังกล่าว วิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีการในข้อ 3.2.4.1.3 ที่อุณหภูมิ 25 °C เปรียบเทียบกับ reaction mixture ที่ไม่มีการใช้สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล คำนวณ % การยับยั้ง (% inhibition) จากสมการที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\% \text{ inhibition} = [(A_0 - A_I)/A_0] \times 100 \quad (1)$$

โดย A_0 = PPO activity ที่ไม่ได้เติมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล

A_I = PPO activity ที่มีการเติมสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล

3.2.5 ศึกษาชนิดและสัดส่วน รวมทั้งประสิทธิภาพของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลในกล้วยตาก

กล้วยตากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้มีสีน้ำตาล แต่ไม่ต้องการให้เกิดสีน้ำตาลดำคล้ำเกินไป โดยกล้วยหลังจากปอกและหั่นจะเกิดสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว และจะเกิดสีน้ำตาลคล้ำเพิ่มขึ้นตามเวลา ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์กล้วยตากที่ได้มีสีน้ำตาลดำคล้ำ ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและประเทศที่นำเข้ากล้วยตาก ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของสารชนิดต่างๆ ในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลในกล้วยตาก โดยเฉพาะในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเนื่องจากเอนไซม์ PPO ซึ่งเกิดขึ้นตั้งแต่มีการปอกและหั่นกล้วยในขั้นเตรียมวัตถุดิบก่อนนำไปอบแห้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์กล้วยตากที่มีคุณภาพดี มีสีน้ำตาลอมเหลือง ไม่ดำคล้ำเกินไป โดยตรวจสอบความสามารถในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลของสารชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก น้ำผึ้ง น้ำสับปะรด เทียบกับสารประกอบซัลไฟต์ โดยแปรชนิดและระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลตามข้อ 3.2.4.2.6 และเปรียบเทียบผลการทดลองกับข้อ 3.2.4.2.6 ว่าประสิทธิภาพของสารชนิดต่างๆ ที่ศึกษาโดยตรง ใน crude PPO ของกล้วยน้ำว้า และที่ศึกษาในผลกล้วยน้ำว้าที่หั่นแว่น มีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกันหรือไม่

นำกล้วยที่ปอกเปลือกและลอกเส้นใยออกแล้ว มาหั่นเป็นแว่นหนาประมาณ 2 cm. จากนั้นนำกล้วยแช่ในสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที (ถ้าใช้เวลาในการแช่กล้วยในสารละลายนานกว่านี้ จะทำให้เนื้อกล้วยยุ่ย และเละได้ เนื่องจากกล้วยที่ใช้ในการทดลองเป็นกล้วยสุกซึ่งมีเนื้อสัมผัสนิ่ม) อัตราส่วนของกล้วยต่อสารละลายเท่ากับ 1 : 2 (w/v) โดยมีตัวอย่างควบคุมคือ กล้วยที่แช่ในน้ำกลั่น จากนั้นนำกล้วยวางบนตะแกรงทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำแล้วไปอบแห้งโดยใช้สภาวะในการอบแห้งที่เลือกจากข้อ 3.2.3 ประเมินคุณภาพโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กล้วยที่แช่ในน้ำกลั่น) ดังนี้

3.2.5.1 ค่าสี L* a* b* ตามข้อ 3.2.3.3

3.2.5.2 เนื้อสัมผัส

ใช้การวัดค่าแรงตัดขาด (cutting force) ตามข้อ 3.2.3.4

3.2.5.3 ปริมาณ hydroxymethylfurfural (HMF)

ใช้การวิเคราะห์ตามวิธีของ Ranganna (1977) (ภาคผนวก ก.7)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.5.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ใช้แบบทดสอบชนิด Hedonic score 9 ระดับ ตามข้อ 3.2.3.5

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

คัดเลือกสารโดยพิจารณาจากค่าสีและเนื้อสัมผัสของกล้วยตาก ร่วมกับคะแนนความชอบทางด้านประสาทสัมผัส เพื่อมาทำการทดลองในขั้นต่อไป

3.2.6 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้วยตากในระหว่างเก็บรักษา และผลของการบรรจุกล้วยตากในสภาวะสุญญากาศ

เนื่องจากกล้วยตากจะเกิดสีน้ำตาลคล้ำได้ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้วยตากในระหว่างเก็บรักษา โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงสีของกล้วยตาก และศึกษาผลของสารชนิดต่างๆ ที่คัดเลือกจาก 3.2.5 รวมทั้งผลของการบรรจุในสภาวะสุญญากาศ ต่อคุณภาพของกล้วยตากในระหว่างเก็บรักษา เพื่อคัดเลือกกระบวนการผลิตที่ดีที่สามารถผลิตกล้วยตากแบบชิ้น ให้มีคุณภาพดี คือ มีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลคล้ำน้อยทั้งในกระบวนการผลิตและเก็บรักษา โดยทำการทดลอง ดังนี้

ผลิตกล้วยตาก โดยใช้สภาวะในการอบแห้งที่เลือกจากข้อ 3.2.3 และใช้สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาลที่เลือกจากข้อ 3.2.5 (อาจเลือกไว้มากกว่า 1 ชนิด) โดยตัวอย่างที่แช่น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม นำผลิตภัณฑ์กล้วยตากที่ได้บรรจุในถุง high density polyethylene (HDPE) ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของความชื้นและแสงได้ดี โดยบรรจุถุงละ 50 กรัม ปิดผนึกด้วยความร้อนจากเครื่องปิดผนึก โดยแยกบรรจุเป็น 2 แบบ คือ แบบธรรมดา และแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านต่างๆ ในระหว่างเก็บรักษา และประเมินคุณภาพของกล้วยตากที่ผ่านการแช่สารชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม รวมทั้งประเมินผลของสภาวะการบรรจุ ดังนี้

3.2.6.1 ค่าสี L* a* b* ตามข้อ 3.2.3.3 (ทุกสัปดาห์)

3.2.6.2 เนื้อสัมผัส ตามข้อ 3.2.3.4 (ทุก 1 เดือน)

3.2.6.3 ปริมาณ HMF ตามข้อ 3.2.5.3 (ทุก 1 เดือน)

3.2.6.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ และรา (ทุก 1 เดือน)

ใช้วิธี viable plate count ในการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา ตามวิธีการของ A.O.A.C.(1995)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric factorial design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.6.5 คุณภาพทางประสาทสัมผัส (ทุก 1 เดือน)

ใช้แบบทดสอบชนิด Hedonic score 9 ระดับ ตามข้อ 3.2.3.5

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย