ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี และการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์

1. การประเมินการเกิดสีน้ำตาลโดยใช้เครื่องวัดสี

การประเมินการเกิดสีน้ำตาลจะใช้วิธีวัดสีด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Hunterlab รุ่น Colorquest XE ใช้การตั้งค่าในการวัดสีในแบบ Ttran ทำการวัดตัวอย่างน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยเติมตัวอย่างในขวดพลาสติกใสขนาด 50 มล. บันทึกค่าที่วัดได้ในระบบ CIE L*C*h° โดย

ค่า L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 0

ค่า C* เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีซีดจาง ถ้า C* มีค่าสูงแสดงว่าวัตถุมีสีเข้ม

ค่า h° เป็นค่าที่แสดงสีที่แท้จริงของวัตถุคือ

0 – 45 องศาแสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง	45 – 90 องศาแสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง
90 – 135 องศาแสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว	135 – 180 องศาแสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว
180 – 225 องศาแสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว	225 – 270 องศาแสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
270 – 315 องศาแสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง	315 – 360 องศาแสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (Total Titrable Acidity (AOAC, 2000))

ปิเปตน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่มา 5 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ (ขวดรูปชมพู่) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ 2 – 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดซิตริก

$$\text{กรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ปริมาตร NaOH (ml) x ความเข้มข้น NaOH (N) x 0.06404 x 100}}{\text{ปริมาตรของน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ (ml)}}$$

(เทียบในรูปของกรดซิตริก) *แฟคเตอร์สำหรับกรดซิตริก = 0.06404

3. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid)

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วิเคราะห์โดยน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่มากรองแยกกากออก หยดน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ได้ลงบน refractometer : Atago ทำการอ่านและบันทึกค่าที่ได้

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay

1) เตรียม 0.1 mM DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) ละลายใน absolute methanol เตรียมทันทีก่อนใช้ เก็บได้นาน ประมาณ 3 วัน

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) ละลายใน absolute ethanol

3) การเตรียมสารตัวอย่าง ใช้ absolute methanol เป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ระดับ

4) ปิเป็ตสารตัวอย่าง แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 500 µl ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด สำหรับชุดควบคุม ให้ใช้น้ำกลั่น 500 µl และ blank น้ำกลั่น 500 µl เมทานอล ปริมาตร 500 µl แทนสารตัวอย่าง แล้วเติม 0.3 mM DPPH หลอดละ 500 µl ยกเว้น blank ให้เติมเมทานอลปริมาตร 500 µl แทน

5) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 517 nm ในทุกสารตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้น นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้ ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH free radical scavenging activity : %) และความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 % (SC_{50})

DPPH free radical scavenging activity (%) = [(A0-A1/A0] X 100

A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

5 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Pate Count)

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดทั้งหมด วิเคราะห์โดยทำการตวงตัวอย่างน้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่แต่ละสภาวะ ตัวอย่างละ 25 มล. ลงในถุงพลาสติคสำหรับเข้าเครื่องตีปั่น ด้วยวิธี aseptic technique เติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วย stomacher จนตัวอย่างกระจายจนทั่ว ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง 1:10 (10^{-1}) ปิเปตตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 10^{-1} มา 1

มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาสำหนับเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย votex mixer จะได้ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง 10^{-2} จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับเจือจาง 10^{-2} มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาสำหนับเจือจางปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย votex mixer จะได้ตัวอย่างที่ได้มีระดับการเจือจาง 10^{-3} ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ด้วยไมโครเวฟจนวุ้นละลายจนหมด พักไว้ให้เย็นชักครู่จึงนำไปใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วในแต่ละระดับการเจือจาง (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 2 จาน เทอาหาร PCA ประมาณ 10 มิลลิลิตร ทับบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาจานและทำการเขย่า/หมุนวนจานจนวุ้นอาหารแผ่กระจายจนทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนวุ้นอาหารแข็งดีแล้ว ทำการคว่ำจานแล้วนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 48 ขั่วโมง ทำการตรวจนับและรายงานผลในหน่วย cfu/ml

6. การเตรียมน้ำยาเจือจาง (Butterfield’s phosphate buffer)

6.1 การเตรียมสารละลายสต๊อค

ละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6.2 การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต๊อค 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ 9 – point hedonic scales

ผลิตภัณฑ์ : น้ำผลไม้ (น้ำมะม่วงหาวมะนาวโห่) **วันที่** : .....

ผู้ทดสอบ : .....

****<u>คำแนะนำ</u>** : กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวา และให้คะแนนความชอบตามที่ท่านรู้สึก ให้ตรงกับรหัสตัวอย่าง (กรุณาบ้วนปากก่อนทดสอบตัวอย่างทุกครั้ง)

<u>สเกลความชอบ</u> 1 = ไม่ชอบมากที่สุด 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 7 =ชอบปานกลาง
2 = ไม่ชอบมาก 5 = เฉยๆ 8 =ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง 6 = ชอบเล็กน้อย 9 =ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะ	**รหัสตัวอย่าง**					
ลักษณะปรากฏ						
สี						
กลิ่น						
รสชาติ						
After taste						
ความชอบโดยรวม						

ข้อเสนอแนะ :

.....

.....

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือ