

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหวีเน่าในกล้วยหอมทอง

ทำการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหวีเน่าในกล้วยหอมทองที่แสดงอาการโรค ด้วยวิธี Tissue transplanting ตัดชิ้นเนื้อเยื่อจากข้าวหวีของกล้วยหอมทองตรงบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เกิดโรค และเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อไปฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย Clorox (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA) และบ่มไว้ในที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์จึงนำไปพิสูจน์โรคตามสมมติฐานของ Koch โดยการใช้ Cock borer เจาะชิ้นส่วนบริเวณขอบโคโลนีเพื่อเอาเส้นใยของเชื้อราไปวางบนข้าวหวีของกล้วยหอมทอง จากนั้นสังเกตอาการของโรคเปรียบเทียบกับกล้วยหอมทองที่เกิดโรคข้าวหวีเน่าที่ปรากฏในตอนแรก และทำการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหวีเน่า จากนั้นคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อรา *Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium* spp. เก็บเป็นเชื้อตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อรา *Collectotrichum musae* และ *Fusarium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 14 วัน เมื่อมีการสร้างโคโคนีเดียจึงใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อชะล้างเอาสปอร์จากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* จะปลูกเชื้อบนผลมังคุด นาน 14 วัน จากนั้นจึงใช้เข็มเย็บปลอดเชื้อขูดเอาสปอร์ที่ผิวผลมังคุด กรองเอาชิ้นส่วนเส้นใยที่ปนมาออก เมื่อได้โคโคนีเดียของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดแล้ว เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้น 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของ Food additives ต่อการงอกของสปอร์

การเตรียมตัวอย่างกล้วยหอมทอง

เตรียมกล้วยหอมทองที่มีความแก่ประมาณ 75-80 เปอร์เซ็นต์ โดยซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี ทำการตัดแต่งคัดเลือกลักษณะหวีที่มีขนาดผลสม่ำเสมอ ปราศจากตำหนิ โรคและแมลง นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำผสมคลอรีน แล้วใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดแต่งบาดแผลของหวีกล้วย

การทดลองที่ 1 ประสิทธิภาพของ Food additives ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าวเหนียวของกล้วยในสภาพ *in vitro*

1.1 การทดสอบผลการงอกของสปอร์ในสภาพที่มี Sodium carbonate, Sodium bicarbonate, Potassium carbonate และ Potassium sorbate

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium* spp. ที่ความเข้มข้น 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร PDA ที่มีส่วนผสม Food additives ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0 (control) 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่พบ ซึ่งจำนวนโคโลนีนับที่ได้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เปรียบเทียบกับ control โดยแต่ละความเข้มข้นมี 4 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Karabulut et al., 2004)

1.2 การทดสอบผลการงอกของสปอร์ใน Ethanol

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium* spp. ที่ความเข้มข้น 5×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร มาผสม ethanol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0 10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที จากนั้นทำให้เจือจาง 1000 เท่าด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ แล้วดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่พบ ซึ่งจำนวนโคโลนีนับที่ได้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เปรียบเทียบกับ control โดยแต่ละความเข้มข้นมี 4 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Karabulut et al., 2004)

การทดลองที่ 2 ผลรวมของ Food additives และความร้อนเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคข้าวผลเน่าในสภาพ *in vitro*

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium* spp. ที่ความเข้มข้น 5×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดทดลอง (แบบที่มีฝาเกลียว) ที่มีสารละลาย Food additive ชนิดและความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายเชื้อราสาเหตุโรคจากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร โดยหลอดทดลองนี้จะแช่อยู่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 27 (อุณหภูมิห้อง) และ 45 องศาเซลเซียส โดยแบ่งเป็นทรีตเมนต์ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 – แช่น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Control-1)

ทรีตเมนต์ที่ 2 – แช่น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Control-2)

ทริตเมนต์ที่ 3 – แช่ใน Food additive (ชนิดและความเข้มข้นที่ดีในการควบคุมเชื้อจากการทดลองที่ 1.1) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Control-3)

ทริตเมนต์ที่ 4 – แช่ใน Food additive (ethanol ความเข้มข้นที่ดีในการควบคุมเชื้อจากการทดลองที่ 1.2) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Control-4)

ทริตเมนต์ที่ 5 – แช่ใน Food additive (ชนิดและความเข้มข้นที่ดีในการควบคุมเชื้อจากการทดลองที่ 1.1) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ทริตเมนต์ที่ 6 – แช่ใน Food additive (ethanol ความเข้มข้นที่ดีในการควบคุมเชื้อจากการทดลองที่ 1.2) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีที่พบ จำนวนโคโลนีนับที่ได้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของสปอร์เปรียบเทียบกับ control โดยแต่ละทริตเมนต์มี 4 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Karabulut et al., 2004)

หมายเหตุ - สาเหตุที่ใช้อุณหภูมิของน้ำร้อนเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เนื่องจาก Reyes et al. (1998) เคยรายงานไว้ว่าการจุ่มกล้วยพันธุ์ Santa Catarina Prata และ Williams ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถลดโรคข้าวหิวเน่าได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ และ Kyu Kyu Win et al. (2007) พบว่ากล้วยหอมทองที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหิวเน่าก่อนนำมาจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถลดการเกิดโรคข้าวหิวเน่าได้ลด 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับทริตเมนต์ควบคุม

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Heated food additives ร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพบรรยากาศดัดแปลงเพื่อควบคุมโรคข้าวหิวเน่าของกล้วยหอมทองที่ได้รับการปลูกเชื้อสาเหตุโรค

นำกล้วยหอมทองที่เตรียมไว้มาทำการพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยผสมของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด (*Collectotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Fusarium* spp.) ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หวี บริเวณแผลรอยตัดของหวีกล้วย โดยใช้เครื่อง Air brush pressure (Model 150-4-PK, Bader Air-Brush Co. Ltd.) จากนั้นบ่มกล้วยไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 6 ชั่วโมง และทำการทดสอบประสิทธิภาพของการทำ Heated food additives ร่วมกับการเก็บรักษาใน

สภาพบรรยากาศดัดแปลงเพื่อควบคุมโรคข้าวหิวเน่าของกล้วยหอมทอง โดยเลือกทรีตเมนต์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายเชื้อราทั้ง 3 ชนิดจากการทดลองที่ 2 ซึ่งแบ่งทรีตเมนต์ได้ ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 – จุ่มผลกล้วยในสารกำจัดเชื้อรา Thaibendazole 500 ppm และบรรจุในถุง PE (เป็นวิธีที่ผู้ส่งออกใช้)

ทรีตเมนต์ที่ 2 – แช่ผลกล้วยในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง PE

ทรีตเมนต์ที่ 3 – แช่ผลกล้วยในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง Active

ทรีตเมนต์ที่ 4 – แช่ผลกล้วยในสารละลาย Heated food additive ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง PE

ทรีตเมนต์ที่ 5 – แช่ผลกล้วยในสารละลาย Heated food additive ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง Active

กล้วยที่ผ่านการจุ่มในสารละลาย Heated food additive จะนำมาทำให้เย็นโดยผ่านน้ำประปานาน 20 นาที เพื่อลดความร้อนสะสมในกล้วย ก่อนบรรจุลงในถุงชนิดต่างๆ จากนั้นเก็บรักษากล้วยที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90-95 นาน 21 วัน หลังจากนั้นจึงนำออกมาเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 10 วัน แต่ละทรีตเมนต์มี 4 ซ้ำๆ ละ 1 หวี

หมายเหตุ - ถุงพลาสติก polyethylene (PE) ที่ใช้ในการทดลองเป็นถุงที่ในปัจจุบันใช้บรรจุกล้วยเพื่อการส่งออกมีขนาด 10 x 15 นิ้ว เจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 8 รู/ถุง ส่วนถุง Active ชนิด EMA film ผลิตโดย ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

การบันทึกผลการทดลอง

ด้านการควบคุมโรค

1. ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคบนข้าวหิวเน่าของกล้วย - โดยตรวจวัดระดับความรุนแรงของโรคใช้เกณฑ์ของ Kyu Kyu Win et al. (2007)
2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคข้าวหิวเน่า
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค
 - Chitinase (Chi) โดยวิธีของ Gupta et al. (1995)
 - Peroxidase (POD) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhang และคณะ (2005)
 - Polyphenol oxidase (PPO) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Duan และคณะ (2007)

ด้านคุณภาพของกล้วยหอมทอง

1. ความแน่นเนื้อ โดยใช้เครื่อง Texture analyser โดยค่าที่ได้แสดงเป็น นิวตัน
2. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก โดยวัดค่า L, a, b และ Hue โดยใช้ Colorimeter
3. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (soluble solid) โดยใช้ Hand refractometer
4. การยอมรับของผู้บริโภคด้านการสุก โดยใช้เกณฑ์ของ เบญจมาศ (2545) ซึ่งแบ่งระยะการสุกของกล้วยเป็น 8 ระยะ
5. อายุการเก็บรักษา (วัน)

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ Heated food additives ร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพบรรยากาศดัดแปลงเพื่อควบคุมโรคข้าวหิวเน่าของกล้วยหอมทองที่มีการเข้าลายของเชื้อตามธรรมชาติ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของการทำ Heated food additives ร่วมกับการเก็บรักษาในสภาพบรรยากาศดัดแปลงเพื่อควบคุมโรคข้าวหิวเน่าของกล้วยหอมทอง กล้วยที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคข้าวหิวเน่าก่อนลงทรีตเมนต์ เพื่อเป็นการจำลองการทดลองในสภาพความเป็นจริงที่เกษตรกรหรือบริษัทส่งออกกล้วยสามารถนำไปปรับใช้ได้ทันที ซึ่งแบ่งทรีตเมนต์ได้ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 – จุ่มผลกล้วยในสารกำจัดเชื้อรา Thaibendazole 500 ppm และบรรจุในถุง PE (เป็นวิธีที่ผู้ส่งออกใช้)

ทรีตเมนต์ที่ 2 – แช่ผลกล้วยในสารละลาย Heated food additive ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง PE

ทรีตเมนต์ที่ 3 – แช่ผลกล้วยในสารละลาย Heated food additive ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และบรรจุในถุง Active

ทรีตเมนต์ที่ 4* – กล้วยที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ และไม่ได้บรรจุในถุง (วางในตะกร้าพลาสติก)

*หมายเหตุ – สำหรับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ความรุนแรงของโรค การสูญเสียน้ำหนักสด และการยอมรับของผู้บริโภคด้านการสุก ได้เพิ่มอีก 1 ทรีตเมนต์ คือ กล้วยที่ไม่ใช้ทั้ง Heated food additive และ สภาพบรรยากาศดัดแปลง

กล้วยที่ผ่านการจุ่มในสารละลาย Heated food additive จะนำมาทำให้เย็นโดยผ่านน้ำประปา นาน 20 นาที เพื่อลดความร้อนสะสมในกล้วย ก่อนบรรจุลงในถุงชนิดต่างๆ จากนั้นเก็บรักษากล้วยที่ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90-95 นาน 21 วัน หลังจากนั้นจึงนำออกมาเก็บ รักษาต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน แต่ละทรีตเมนต์มี 10 ซ้ำๆ ละ 1 หวี ทั้งนี้เพื่ ลดความแปรปรวนที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อที่ปรากฏขึ้นตามธรรมชาติ

ในการทดลองครั้งนี้จะทำซ้ำ 2 ครั้ง หรือใช้กล้วยจาก 2 แหล่งผลิต โดยครั้งแรกจะใช้กล้วยหอม ทองที่ปลูกในจังหวัดลพบุรี และครั้งที่ 2 จะใช้กล้วยที่ปลูกในจังหวัดนครนายก เพื่อเปรียบเทียบและ ยืนยันผลการทดลอง เนื่องจากกล้วยแต่ละแหล่งปลูกอาจจะมีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณที่แตกต่าง กัน

การบันทึกผลการทดลอง

ด้านการควบคุมโรคข้าวหีเน่า

1. ระดับความรุนแรงของการเกิดโรคบนข้าวหีของกล้วย
2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค – โดยการนำเนื้อเยื่อส่วนข้าวผลมาทำการวิเคราะห์ กิจกรรมเอนไซม์
 - Chitinase
 - Peroxidase
 - Polyphenol oxidase

ด้านคุณภาพของกล้วยหอมทอง

1. ความแน่นเนื้อ โดยใช้เครื่อง Texture analyser โดยค่าที่ได้แสดงเป็น นิวตัน
2. การสูญเสียน้ำหนักสด โดยค่าที่ได้แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์
3. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก โดยวัดค่า L, a, b และ Hue โดยใช้ Colorimeter
4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar content) (Dubois และคณะ)
5. ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบรรจุ
6. การยอมรับของผู้บริโภคด้านการสุก โดยใช้เกณฑ์ของของ เบญจมาศ (2545)
7. อายุการเก็บรักษา (วัน)

วิเคราะห์ผลการทดลอง

1. ความรุนแรงของการเกิดโรคผลเน่าโดยการให้คะแนน

ตรวจวัดระดับความรุนแรงของโรค ซึ่งมี 6 ระดับดังนี้

- 0 = ไม่เกิดโรค
- 1 = เกิดโรคเล็กน้อย และปรากฏกลุ่มของเส้นใยบริเวณรอยตัด
- 2 = เกิดโรค 25เปอร์เซ็นต์ ของข้าวหวี
- 3 = เกิดโรค 50เปอร์เซ็นต์ ของข้าวหวี
- 4 = เกิดโรค 75เปอร์เซ็นต์ ของข้าวหวี
- 5 = เกิดโรค 100เปอร์เซ็นต์ ของข้าวหวี
- 6 = เกิดโรคทั่วทั้งข้าวหวีและลุกลามไปยังข้าวผล

2. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค คำนวณโดยใช้สมการ

$$\% \text{ การเกิดโรค} = (N_s/N_t) \times 100$$

เมื่อ

N_s = จำนวนผลกล้วยหอมที่เกิดโรคผลเน่า

N_t = จำนวนผลกล้วยหอมทั้งหมด

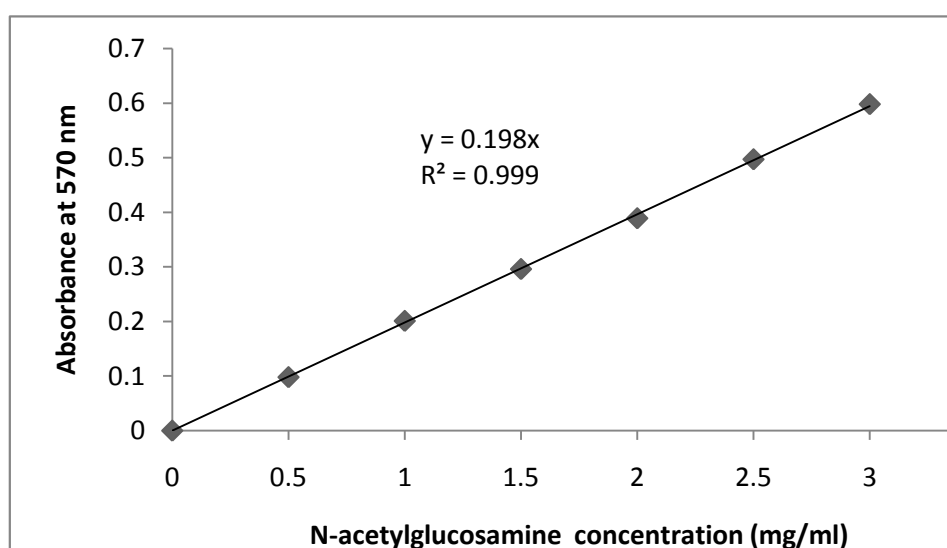
3. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Chitinase (Chi)

3.1 การเตรียม Crud enzyme

ซึ่งเปลือกกล้วยแช่แข็งบดละเอียดจำนวน 0.1 กรัม เติม Acetate buffer pH 5.2 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มี β -mercaptoethanol ความเข้มข้น 15 มิลลิโมล ผสมอยู่ โดยเติมจำนวน 8 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง Homogenize เป็นเวลา 1 นาที นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง และนำส่วนใสที่ได้ เติมนลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 16,000 Xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนใสใส่งในหลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

เติม Colloidal chitin 2 กรัม ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Citrate buffer pH 6.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร และ Crud enzyme จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ผสมเข้ากันแล้วไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเปิดส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร เติกลงในหลอดทดลอง และเติม สารละลาย DNS จำนวน 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดทดลองจุ่มลงในน้ำเย็นทันที เติมน้ำจำนวน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเทียบกราฟมาตรฐาน N-acetylglucosamine (รูปที่ 3.1) เพื่อคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (Unit/ml)



รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของ N-acetylglucosamine สำหรับคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส

4. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Peroxidase (POD)

เตรียม Reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย crude enzyme (supernatant) ปริมาตร 1 ml, Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) 1 ml และ substrate 1 ml ผสมกันอย่างรวดเร็ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร โดยผลที่ได้นำไปคำนวณในหน่วยการเปลี่ยนแปลงค่า OD_{470}/mg protein.min

4.1 วิธีเตรียม substrate

เติม guaiacol ปริมาตร 0.248 ml ลงใน Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) 100 ml แล้วเติม H_2O_2 666.66 ไมโครลิตร ลงไป เขย่าแรงๆ ใส่ขวดหุ้มฟอยด์ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2 การหาโปรตีนในเปลือกกล้วยหอมสำหรับวัดกิจกรรมของ POD และ PPO

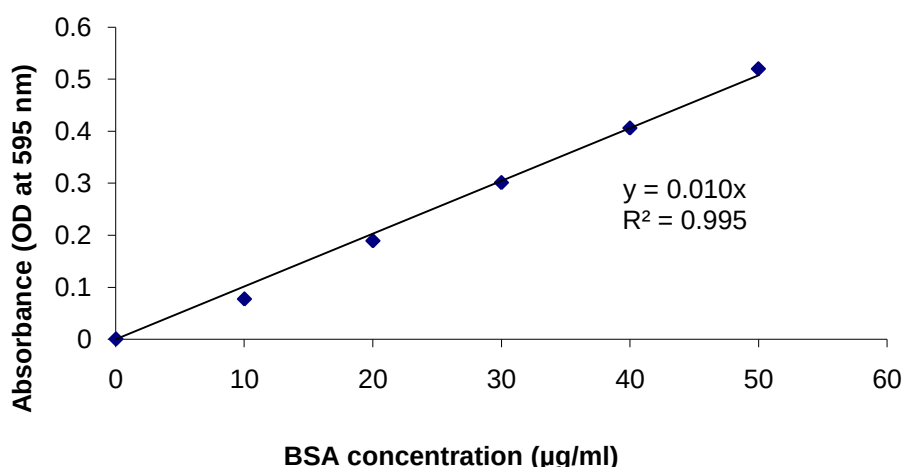
ใช้ supernatant ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Coomassie blue 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (3.1) เพื่อหาปริมาณโปรตีนแล้วคำนวณหากิจกรรมของ POD และ PPO

4.3 การเตรียมสารละลาย coomassie blue

ชั่งสาร coomassie blue จำนวน 100 มิลลิกรัม นำมาละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 50 มิลลิลิตร จนกระทั่ง coomassie blue ละลายจนหมดแล้วจึงทำการเติมสาร phosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปกรองด้วย กระดาษกรอง whatman เบอร์ 2

4.4 การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งสารโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin) 2.5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย phosphate buffer 0.05 โมลาร์ (pH 7.0) 25 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายที่มีโปรตีน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย phosphat buffer ให้ได้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ 5)



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐาน BSA สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ POD และ PPO

5. กิจกรรมของเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO) (ดัดแปลงจากวิธีของ Duan และคณะ, 2007)

นำเปลือกกล้วยหอมมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วชั่งน้ำหนัก 5 กรัม แล้วบดในสารละลาย Phosphate buffer (pH 7.0 และเย็น) 0.05 โมลลาร์ จำนวน 20 มิลลิลิตร (บดในสภาพที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เติมน้ำ polyvinyl pyrrolidone จำนวน 0.5 กรัม แล้วนำไปปั่นให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 19,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนของสารละลายใส (supernatant) มาวิเคราะห์หา กิจกรรมเอนไซม์ PPO และ ปริมาณ โปรตีน

5.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PPO

นำ crude enzyme (supernatant) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำสารละลาย Catechol (0.1 โมลลาร์) ปริมาตร 1 ml และ Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลลาร์ (pH 7.0) 2 ml ผสมกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยผลที่ได้นำไปคำนวณในหน่วยการเปลี่ยนแปลงค่า OD₄₁₀/mg protein.min

5.2 การหาโปรตีนในเปลือกกล้วยหอมสำหรับวัดกิจกรรมของ PPO

ปฏิบัติตามข้อ 4.2

6. ความแน่นเนื้อ

วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (TA-XT2 : Texture analyzer) ใช้หัวกดขนาด P/6 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตั้งระยะทางระหว่างฐานกับปลายหัวกด 40 เซนติเมตร กำหนดค่าให้หัวกดจะเข้าไปในเนื้อกล้วยหอมบริเวณกลางผล 5 มิลลิเมตร ความเร็วในการกด 1 มิลลิเมตร/วินาที บันทึกค่าความแน่นเนื้อที่ได้ในหน่วยนิวตัน วัดโดยนำผลกล้วยหอมวางให้หัวกดตั้งฉากกับผลกล้วยหอมเพื่อให้หัวกดแทงเข้าเนื้อให้ได้ระยะตามที่ตั้งไว้

7. การสูญเสียน้ำหนักสด

นำผลกล้วยหอมมาชั่งน้ำหนักสดก่อนการเก็บรักษาและหลังการเก็บรักษา แล้วนำน้ำหนักที่ได้มาคำนวณเป็นร้อยละของการสูญเสียน้ำหนัก โดยคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ Weight loss} = [(W_{IN} - W_{FI}) / W_{IN}] \times 100$$

เมื่อ

$$W_{IN} = \text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}$$

$$W_{FI} = \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}$$

8. การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก

วิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดสี (Colorimeter) Minolta รุ่น DP-301 และรายงานผลออกมาเป็นหน่วยต่างๆ ดังนี้

ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100

กรณีที่ ค่า L เท่ากับ 100 หมายถึง สีขาว

ค่า L เท่ากับ 0 หมายถึง สีดำ

ค่า a เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียวถึงสีแดงในแกนนอน

กรณีที่ ค่า a เป็นลบ หมายถึง สีเขียว

ค่า a เป็นบวก หมายถึง สีแดง

ค่า b เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงินถึงสีเหลืองในแกนตั้ง

กรณีที่ ค่า b เป็นลบ หมายถึง สีน้ำเงิน

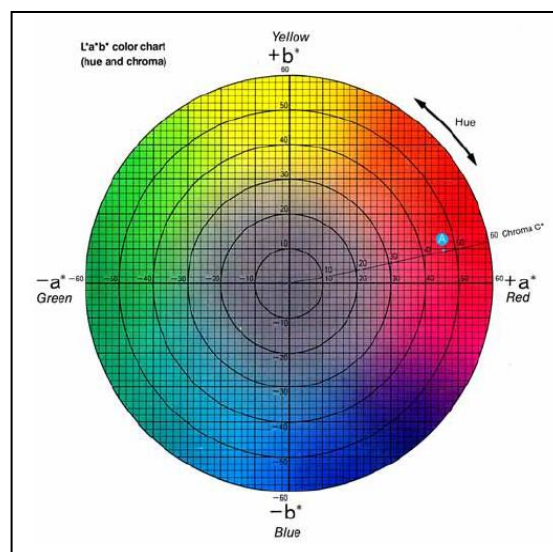
ค่า b เป็นบวก หมายถึง สีเหลือง

ค่า Hue angle (Degree) เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของโทนสีในระดับต่าง ๆ ที่เปลี่ยนไปตามค่ามุม ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Hue angle (Degree)} = (\tan^{-1} b/a) \quad \text{เมื่อค่า } a > 0 \text{ และ } b \geq 0$$

$$\text{Hue angle (Degree)} = 180^\circ + (\tan^{-1} b/a) \quad \text{เมื่อค่า } a < 0$$

$$\text{Hue angle (Degree)} = 360^\circ + (\tan^{-1} b/a) \quad \text{เมื่อค่า } a > 0 \text{ และ } b < 0$$



รูปที่ 3.3 Chromaticity diagram

การเปลี่ยนแปลงสี (ค่า ΔE) โดยคำนวณตามสูตร

$$\Delta E^{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

$\Delta L = L$ ของตัวอย่าง $-L$ ของตัวอย่างมาตรฐาน

$\Delta a = a$ ของตัวอย่าง $-a$ ของตัวอย่างมาตรฐาน

$\Delta b = b$ ของตัวอย่าง $-b$ ของตัวอย่างมาตรฐาน

9. การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar content)

ชั่งตัวอย่างกล้วย 1 กรัม ผสมกับ ethanol ที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenize เป็นเวลา 1 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์วัตแมนเบอร์ 4 นำส่วนใส่ที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ไปเจือจางด้วย ethanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้น นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ผสมกับ phenol (ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์) 1 มิลลิลิตร และ H_2SO_4 (ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์) 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

10. ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบรรจุ

ทำการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนภายในบรรจุภัณฑ์โดยใช้เครื่อง Oxybaby V O₂/CO₂ ยี่ห้อ WITT-GASETECHNIK ประเทศ Germany ทำการวัดโดยใช้หัววัดเสียบเข้าไปภายในภาชนะบรรจุและรายงานผลเป็นความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) ของก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

11. การยอมรับของผู้บริโภคด้านการสุก

แบ่งระยะการสุกเป็น 8 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 เปลือกเขียว ผลแข็ง ไม่มีการสุก

ระยะที่ 2 เริ่มเปลี่ยนสีจากเขียวออกเหลืองเล็กน้อย

ระยะที่ 3 เริ่มเปลี่ยนสีจากเขียวออกเหลืองมากขึ้น แต่ยังมีสีเขียวมากกว่าสีเหลือง

ระยะที่ 4 เริ่มเปลี่ยนสีจากเขียวออกเหลือง และมีสีเหลืองมากกว่ามีเขียว

ระยะที่ 5 เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ปลายยังเป็นสีเขียว

ระยะที่ 6 ทั้งผลมีสีเหลือง (ผลสุก)

ระยะที่ 7 ผิวสีเหลือง และเริ่มมีจุดสีน้ำตาล (สุกเต็มที่มักกลิ่นหอม)

ระยะที่ 8 ผิวสีเหลืองและเริ่มมีจุดสีน้ำตาลมากขึ้น (สุกมากเกินไป เนื้อเริ่มอ่อนตัวและ กลิ่นแรง)



รูปที่ 3.4 แสดงระยะการสุกของผลกล้วย (เบญจมาศ ศิลาชัย , 2545)