บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1 วัสดุอุปกรณ์

1.1 พืชทดลอง

หน่อไม้ฝรั่งพันธุ์บรอคอิมพรูฟ เก็บเกี่ยวจากสวนหน่อไม้ฝรั่งในตำบลหนองปลาไหล อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในการทดลองที่ 1 เก็บเกี่ยวในวันที่ 4 พฤษภาคม พ.ศ.2550 สภาพอากาศทั่วไปมีฝนตกหนัก และการทดลองที่สอง เก็บเกี่ยวในวันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ.2550 สภาพอากาศทั่วไปมีอากาศค่อนข้างร้อน หน่อไม้ฝรั่งในทั้งสองการทดลองเก็บเกี่ยวในช่วงเช้าและคัดเลือกให้มีลักษณะเฉพาะเกรดบี (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 เซนติเมตร และความยาว 25 เซนติเมตร) บริเวณปลายยอดตูมและสภาพสมบูรณ์ทั้งหน่อ ขนส่งถึงห้องปฏิบัติการโดยรถปรับอากาศเหมือนกันทั้ง 2 การทดลองภายในเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากเก็บเกี่ยว ระหว่างขนส่งบรรจุหน่อไม้ฝรั่งในลังโฟมและจัดหน่อให้อยู่ในแนวตั้งตลอด

1.2 อุปกรณ์

กระดาษฟางสีน้ำตาล

กระบอกและถาดสำหรับจุ่มไคโตซาน

ถุงพลาสติกร้อนขนาด 8x30 เซนติเมตร

ถุงพลาสติกร้อนขนาด 10x12 เซนติเมตร

ถุงซิบขนาด 8x12 เซนติเมตร

อะลูมิเนียมฟอยล์

กระดาษ label

เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สายวัด

เครื่องวัดสีย่ี่ห้อ Konica Minolta รุ่น CR-10

บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร

กระบอกตวงขนาด 10, 50, 100, 500 , 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร

ตะแกรงทองเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.180 มิลลิเมตร
แท่นให้ความร้อน
ไมโครปิเปตขนาด 10, 20, 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
ไมโครปิเปตทิปขนาด 20, 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร
เทอร์โมมิเตอร์
กล้องถ่ายรูปชนิดดิจิตอล
กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
โกร่งและสาก
กระบอกน้ำกลั่น
กรวยแก้ว
ท่อพีวีซีพร้อมฝาปิดขนาดยาว 30 เซนติเมตร กว้าง 1 นิ้วครึ่ง
ขวดเก็บน้ำเกลือขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง
หลอดฉีดยาขนาด 5, 15 มิลลิลิตร พร้อมกระบอกฉีด
ลังโฟม
กระติกน้ำแข็งแบบอะลูมิเนียม
ขวดบรรจุสารเคมีขนาด 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร
แท่นวางหลอดทดลองขนาด 1.5 และ 15 มิลลิลิตร
หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
ตู้อบ 60 และ 180 องศาเซลเซียส
เตาไมโครเวฟ
เครื่องวัดค่ากรด-เบส
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)
ชุดแยกกรดนิวคลีอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบยี่ห้อ Bio-Rad
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
เครื่อง Gas chromatograph ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-8A
ตู้เย็น
ตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20^{0}C และ -80^{0}C
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

1.3 สารเคมี

ไคโตซานยี่ห้อ Orchid-80 ชนิด oligomer ประมาณ 150±25 เมอร์ ที่มีเปอร์เซ็นต์ deacetylation เท่ากับ 80 น้ำหนักโมเลกุล 30,000 เตรียมโดยเจือจางกับน้ำกรอง

น้ำเกลืออิ่มตัว

น้ำกลั่น

น้ำกรอง

Liquid nitrogen

Sodium hydroxide

80% acetone

Tris-base

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

β-mercaptoethanol

Cetyl trimemethylammonium bromide (CTAB)

80% และ 100% ethanol

Phenol

Chloroform

Boric acid

Potassium dihydrogen phosphate

Dipotassium hydrogen phosphate

Pyrocatechol

Bio-Rad D_c protein assay reagent B

Bovine serum albumin

2 วิธีการทดลอง

2.1 การหาวิธีการให้ไคโตซานและความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานต่อการรักษาคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของหน่อไม้ฝรั่ง

แบ่งหน่อไม้ฝรั่งเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 ให้ไคโตซานแบบจุ่มสูงจากโคน 5 เซนติเมตร และกลุ่มที่ 2 ให้ไคโตซานแบบแช่ทั้งหน่อ ทั้งสองกลุ่มให้ไคโตซานเป็นเวลา 5 นาที วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยในแต่ละกลุ่มมี 7 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยมีชุดการทดลอง ดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

<u>กลุ่มที่ 1</u>

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่จุ่มน้ำหรือไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 2 คือ จุ่มในน้ำเปล่า

ชุดการทดลองที่ 3 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 10 ppm

ชุดการทดลองที่ 5 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 25 ppm

ชุดการทดลองที่ 6 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 50 ppm

ชุดการทดลองที่ 7 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 100 ppm

<u>กลุ่มที่ 2</u>

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่แช่น้ำหรือไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 2 คือ แช่ในน้ำเปล่า

ชุดการทดลองที่ 3 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 10 ppm

ชุดการทดลองที่ 5 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 25 ppm

ชุดการทดลองที่ 6 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 50 ppm

ชุดการทดลองที่ 7 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 100 ppm

หลังจากจุ่มหรือแช่ในไคโตซานแล้ว ผึ่งจนแห้งแล้วห่อด้วยกระดาษฟางสีน้ำตาล ใส่ถุงร้อนขนาดยาว 30 เซนติเมตรมัดปิดด้วยหนังยาง แล้วเก็บรักษาหน่อแบบตั้งในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 หลังจากได้รับไคโตซาน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาดังนี้

2.1.1 ลักษณะที่ปรากฏภายนอก

ทำโดยการให้คะแนนตั้งแต่ 5-1 คะแนน โดยอาศัยเกณฑ์ดังต่อไปนี้

5 คะแนน สำหรับหน่อที่มีลักษณะเหมือนเพิ่งเก็บเกี่ยวจากสวน

4 คะแนน สำหรับหน่อที่มีสีน้ำตาลเกิดบริเวณยอดหรือตา

3 คะแนน สำหรับหน่อที่มีสีน้ำตาลบริเวณยอดหรือตามากขึ้นหรือมีอาการเหี่ยวที่ผิว

2 คะแนน สำหรับหน่อที่มีสีน้ำตาลบริเวณยอดหรือตาและมีอาการเหี่ยวบริเวณผิวหรือมีอาการโค้งงอ

1 คะแนน สำหรับหน่อที่มีสีน้ำตาลบริเวณยอดหรือตาและมีอาการเหี่ยวบริเวณผิวและมีอาการโค้งงอ

โดยหน่อที่มีคะแนนต่ำกว่า 3 คะแนนถือว่าไม่สามารถยอมรับได้

2.1.2 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักสด

ชั่งหน่อไม้ฝรั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งทั้งก่อนและหลังการให้ไคโตซาน แล้วคำนวณออกมาในรูปเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสดที่ยังเหลืออยู่ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ของการสูญเสียน้ำหนักสด} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังเก็บรักษา})}{\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา}} \times 100$$

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงความยาว

วัดความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปของหน่อโดยสายวัดซึ่งมีทศนิยม 1 ตำแหน่งและคำนวณออกมาในรูปเปอร์เซ็นต์ของความยาวที่เพิ่มขึ้นดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ของความยาวที่เพิ่มขึ้น} = \frac{(\text{ความยาวหลังเก็บรักษา} - \text{ความยาวก่อนเก็บรักษา})}{\text{ความยาวก่อนเก็บรักษา}} \times 100$$

2.1.4 อัตราการหายใจ

ทำโดยเก็บหน่อไม้ฝรั่งในหลอดพีวีซีปริมาตร 238.35 มิลลิลิตรที่ปิดสนิทเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บอากาศภายในหลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำมาแทนที่ในน้ำเกลืออิ่มตัวบรรจุในขวดปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำอากาศที่เก็บได้นั้นไปวิเคราะห์ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง Gas chromatograph ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น G-8A คอลัมภ์บรรจุด้วย Porapak ที่อุณหภูมิ injection/detection เท่ากับ 80/150 mesh thermal conductivity detector อุณภูมิคอลัมภ์เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน และคำนวณอัตราการใจดังแสดงในภาคผนวก

2.1.5 ปริมาณเส้นใยทั้งหมด (ฉัตรวรุณ พจนการุณ, 2548)

การสกัดเส้นใย ทำโดยบดหน่อไม้ฝรั่งบริเวณสูงจากโคน 5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 1.5 กรัม ด้วยโกร่ง ใส่น้ำเดือด 12 มิลลิลิตรเทลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที กรองเบื้องต้นด้วยตะแกรงทองเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.180 มิลลิเมตร ฉีดล้างเส้นใยให้เป็นสีขาวด้วยน้ำกลั่น เทเส้นใยลงในกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนัก คำนวณเทียบออกมาในรูปเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเส้นใยต่อน้ำหนักสด ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ ปริมาณเส้นใย} = \frac{\text{น้ำหนักเส้นใย}}{\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา}} \times 100$$

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันโดยการทดสอบ Least significantly difference ที่ค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05

2.2 ผลของไคโตซานต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของหน่อไม้ฝรั่งหลังการเก็บเกี่ยว

เลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมต่อการยืดอายุหน่อไม้ฝรั่งจากการทดลองที่ 1 กลุ่มละ 2 ชุดการทดลอง ทุกชุดการทดลองได้รับไคโตซานเป็นเวลา 5 นาที เทียบกับชุดการทดลองควบคุมรวมเป็น 5 ชุดการทดลอง และวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยชุดการทดลองที่ถูกเลือกมามีดังนี้

กลุ่มที่ 1

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดควบคุมซึ่งไม่จุ่มน้ำเปล่าหรือไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 2 คือ จุ่มใจไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 คือ จุ่มในไคโตซานความเข้มข้น 100 ppm

กลุ่มที่ 2

ชุดการทดลองที่ 1 คือ ชุดควบคุมซึ่งไม่แช่น้ำเปล่าหรือไคโตซาน

ชุดการทดลองที่ 2 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 5 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 คือ แช่ในไคโตซานความเข้มข้น 100 ppm

หลังจากจุ่มหรือแช่แล้วเก็บรักษาที่สภาวะเช่นเดียวกันกับในการทดลองที่ 1 เป็นเวลา 15 วัน และวัดการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด

เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ วิธีทำและการคำนวณทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1.2

2.2.2 ปริมาณเส้นใย

เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ วิธีทำและการคำนวณทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1.5

2.2.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (ดัดแปลงจาก Devesa และคณะ, 2007)

เก็บผลการทดลองในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ การสกัดคลอโรฟิลล์ทำได้โดยบดยอดหน่อไม้ฝรั่งสดน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ด้วยโกร่งบด ใส่ 80% acetone ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนผสมลงในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็ว ปิดฝาให้สนิทและเก็บในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน นำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 646.8 และ 663.2 นำมาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ดังสมการต่อไปนี้

คลอโรฟิลล์ a (C_a) = $12.25(A_{663.2}) - 2.79(A_{646.8})$

คลอโรฟิลล์ b (C_b) = $21.5(A_{646.8}) - 5.1(A_{663.2})$

แคโรทีนอยด์ = $\frac{[1000(A_{470}) - 1.82(C_a) - 85 - 0.02(C_b)]}{198}$

2.2.4 แอคติวิตีของเอนไซม์ polyphenol oxidase

เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12 ชั่วโมง 1, 2, 3, 6, 9, 12 และ 15 วัน ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำโดยเก็บบริเวณยอดน้ำหนักประมาณ 1.5 กรัมในกระดาษฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำไปสกัดโปรตีนและวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Montgomery และ Sgarbieri (1975) ดังแสดงในภาคผนวก คำนวณอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีน

2.2.5 การสลายของ DNA

เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, ชั่วโมง 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15 วันหลังจากได้รับไคโตซาน โดยเก็บบริเวณยอดน้ำหนักประมาณ 0.1-0.2 กรัมในกระดาษฟอยล์ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำไปสกัด genomic DNA ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Thikart และคณะ (2005) ดังภาคผนวก

หลังจากนั้นวัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงและตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดยวิธี gel electrophoresis ใช้ 1% agarose gel (W/V) ในสารละลาย 0.5X TBE ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที แล้วย้อมแถบ DNA ที่ได้ด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc