

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

พืชทดลอง

ลำไยพันธุ์ดอ จากสวนลำไยของเกษตรกรในจังหวัดลำพูน และจังหวัดเชียงใหม่

สารเคมี

1. กรดซิตริก
2. กรดแอสคอร์บิก
3. กรดออกซาลิก
4. สารเคมีที่ใช้ในการการสกัดและการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase : PPO)

- bovine serum albumin (BSA)
- catechol
- copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- di – potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)
- Folin – Ciocalteu reagent
- potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- polyvinylpyrrolidone (PVPP)
- potassium chloride (KCl)
- potassium tartrate ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COOK} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$)
- sodium carbonate (Na_2CO_3)
- sodium hydroxide (NaOH)

5. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาลักษณะเปลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

- glutaraldehyde ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์
- ethanol
- acetone

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ (hand refractrometer) รุ่น model-1 ของ ATAGO
2. เครื่องผลิตก๊าซโอโซน (ozone generator)
3. เครื่องวัดความเข้มข้นของโอโซน (ozone detector) ของ Eminent, LTD.
4. เครื่องวัดสี (colorimeter) รุ่น DR-200 ยี่ห้อ minolta
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น XT 920 M ยี่ห้อ Precisa
6. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (firmness tester)
7. pH meter รุ่น TOLEDO 320 ยี่ห้อ METTLER
8. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5910LV
9. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาเอนไซม์ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase : PPO)
 - 9.1 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ หลอดทดลอง ขวดรูปชมพู่ กระจกบดวง ปีกเกอร์ ขวดใส่สารเคมี เป็นต้น
 - 9.2 อะลูมิเนียมฟลอยด์
 - 9.3 กระดาษกรอง
 - 9.4 หลอดหยด
 - 9.5 ปิเปต
 - 9.6 เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง รุ่น Z383K Hermle
 - 9.7 เครื่อง visible spectrophotometer รุ่น Thermo Spectronic
 - 9.8 เครื่อง rotamixer ของ Hooke & Tucker, LTD.
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
11. ตู้รมโอโซน กว้างxยาวxสูง เท่ากับ 30x30x30 เซนติเมตร
12. กล่องพลาสติกขนาด 3.5x5.5 นิ้ว
13. แผ่นฟิล์มถนอมอาหาร

วิธีการวิจัย

การเตรียมผลลำไย

ใช้ผลลำไยพันธุ์คอ ซึ่งเก็บเกี่ยวมาจากสวนของเกษตรกรในจังหวัดลำพูน ภายในเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง โดยทำการคัดเลือกผลลำไยที่เจริญเต็มที่ มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีรอยตำหนิจากโรค และแมลง ตัดก้านออกให้เหลือประมาณ 5 มิลลิเมตร

การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาในการให้โอโซนที่เหมาะสมต่อการควบคุมการเกิดโรคของผลลำไย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 120 ผล จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลลำไย 40 ผล เพื่อแบ่งใส่กล่องพลาสติก กล่องละ 20 ผล จำนวน 6 กล่อง

ปล่อยก๊าซโอโซนจากเครื่องผลิตก๊าซโอโซน (ozone generator) อัตรา 1000 มิลลิกรัม/ชั่วโมง ความเข้มข้น 200 ppm ผ่านเข้าไปในตู้รมโอโซน (ภาพภาคผนวก 1) ที่มีผลลำไย เป็นระยะเวลาตามแต่ละกรรมวิธี ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่รมก๊าซโอโซน (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 รมด้วยโอโซน นาน 15 นาที

กรรมวิธีที่ 3 รมด้วยโอโซน นาน 30 นาที

กรรมวิธีที่ 4 รมด้วยโอโซน นาน 60 นาที

กรรมวิธีที่ 5 รมด้วยโอโซน นาน 120 นาที

เมื่อครบกำหนดเวลา นำผลลำไยแบ่งใส่กล่องพลาสติกขนาด 3.5x5.5 นิ้ว แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาเริ่มต้นและเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน

การบันทึกผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือก โดยใช้เครื่องวัดสี colorimeter Minolta DR-200 วัดค่าสีเปลือกของผลด้านข้าง ค่าวัดสีที่ได้จะแสดงในรูป L^* , a^* และ b^*

ค่า L^* แสดงความสว่างเมื่อใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อใกล้ 0

ค่า a^* มีค่าเป็น + แสดงว่าสีผิวมีสีออกแดง

- แสดงว่าสีผิวมีสีออกเขียว

โดย a^* มีค่าตั้งแต่ - 60 ถึง +60

ค่า b^* มีค่าเป็น + แสดงว่าสีผิวมีสีออกเหลือง

- แสดงว่าสีผิวมีสีออกน้ำเงิน

โดย b^* มีค่าตั้งแต่ - 60 ถึง +60

ทั้งค่า a^* และ b^* หากมีค่าเป็น 0 แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids : TSS) นำเนื้อลำไยมาคั้นเอาเฉพาะน้ำ แล้ววัดหาค่า TSS ด้วย hand refractometer อ่านค่าเป็น องศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix)

3. ความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลลำไย ผ่าแบ่งครึ่งเป็น 2 ซีก นำซีกที่ไม่มีเมล็ดวัดค่าความแน่นเนื้อ ด้วยหัวกรวยเส้นผ่านศูนย์กลาง = 0.6 เซนติเมตร หน่วยเป็นกิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

4. การเกิดโรค โดยพิจารณาจากการปรากฏให้เห็นของเชื้อราที่ผลลำไยทุกผลในแต่ละกรรมวิธีทุกวัน บันทึกเป็นระดับคะแนน 1-5 ดังนี้

คะแนน 1 = ไม่ปรากฏให้เห็นเชื้อราจนถึงเห็นเชื้อราที่ผลลำไยไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 2 = เห็นเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 21-40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 3 = เห็นเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 41-60 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 4 = เห็นเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 61-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 5 = เห็นเชื้อราที่ผลลำไยเป็น 81-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรค = $\frac{\text{ผลรวมระดับคะแนนของทุกผล}}{\text{จำนวนผล}}$

จำนวนผล

5. การตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการ total plate count ซึ่งมีวิธีการดังนี้

5.1 นำผลลำไยที่เลือกแบบสุ่มมา 3 ลูก ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในมีน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร เขย่านานประมาณ 1 นาที

5.2 ใช้ pipette ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว คูดสารละลายภายใน flask มา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้อัตราส่วน 1/100 และ 1/1000

5.3 นำสารละลายในแต่ละการเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ใน Petri-dishes ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) แล้วทำการ spread plate โดยใช้ spreader แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

5.4 ทำการนับจำนวนโคโลนี รายงานผลเป็น CFU/ml เมื่อปั๊มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

การทดลองที่ 2 ผลของโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อของเปลือกผลลำไย

นำเปลือกผลลำไยมาดูแลักษณะเปลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) โดยนำเปลือกผลลำไยในแต่ละชุดการทดลองมาตัดให้มีขนาด 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปวางใน Petri dish นำกระดาษกรองวางใน Petri dish แล้วหยด glutaraldehyde ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ บนกระดาษกรองประมาณ 3-4 หยด ปิดฝา ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา dehydrate ด้วย แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นละ 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน acetone ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปทำ critical point drying ทันที หลังจากนั้นทำ mounting และ coating ด้วยทอง แล้วนำไปดูด้วยกล้อง SEM เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อของเปลือกผลหลังจากได้รับโอโซน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

การทดลองที่ 3 ผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์บางชนิดต่อคุณภาพของผลลำไย

นำผลมาแช่ในสารละลายกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก และกรดออกซาลิก วัดค่า pH ของสารละลายกรด ทั้ง 3 ชนิดที่ทุกระดับความเข้มข้นด้วยเครื่อง pH-meter วางแผนการทดลอง 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 960 ผล ในแต่ละกรรมวิธีแช่ผลลำไยที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที โดยระดับความเข้มข้นละ 120 ผล จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ 40 ผล แช่ผลลำไยตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่ในสารละลายกรดซิตริกที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ในสารละลายกรดซิตริกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่ในสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่ในสารละลายกรดออกซาลิกที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

เป็นระยะเวลา 5 นาที

กรรมวิธีที่ 7 แขนในสารละลายกรดออกซาลิกที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
เป็นระยะเวลา 5 นาที

เมื่อครบกำหนดเวลา นำผลลำไยที่ผ่านการแช่ในสารละลายมาผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นแบ่ง
ใส่กล่องพลาสติกขนาด 3.5x5.5 นิ้ว แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร นำไปเก็บรักษาที่
อุณหภูมิห้อง

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลลำไย แต่ละระดับความเข้มข้นที่ระยะเวลา 5
และ 10 นาที ศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2. การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลโดยประเมินด้วยสายตา บันทึกเปอร์เซ็นต์พื้นที่เกิด
สีน้ำตาลของเปลือกผลของผลลำไย โดยกำหนดคะแนน 1-5 ดังนี้

คะแนน 1 = สีเปลือกผลลำไยไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไม่เกิน 20
เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 2 = สีเปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 21-40 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 3 = สีเปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 41-60 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 4 = สีเปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 61-80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนน 5 = สีเปลือกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 81-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เปลือกทั้งหมด

คะแนนเฉลี่ยการเกิดสีน้ำตาล = $\frac{\text{ผลรวมระดับคะแนนของทุกผล}}{\text{จำนวนผล}}$

จำนวนผล

3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids : TSS) เช่นเดียวกับการ
ทดลองที่ 1

4. ความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลลำไย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

5. การเกิดโรค เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 4 ผลของโอโซนร่วมกับกรดอินทรีย์บางชนิดต่อคุณภาพและแอคติวิตีของเอนไซม์ PPO ของผลลำไย

นำผลการทดลองจากการแช่ผลลำไยในกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นและเวลาในการแช่ที่ให้ผลดีที่สุด จากการทดลองที่ 3 มารวมด้วยโอโซนที่ระยะเวลาที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 โดยใช้จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 60 ผล เมื่อครบกำหนดเวลา นำผลลำไยแบ่งใส่กล่องพลาสติกขนาด 3.5x5.5 นิ้ว แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มถนอมอาหาร นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของผลลำไยทุก 7 วัน เป็นเวลา 30 วัน โดยบันทึกผลในเรื่องต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1
2. การเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลโดยประเมินด้วยสายตา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3
3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids : TSS) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1
4. ความแน่นเนื้อ (firmness) ของผลลำไย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1
5. การเกิดโรค เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6. บันทึกการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการ total plate count เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

7. การประเมินคุณภาพในการบริโภค โดยเป็นการประเมินตามลักษณะคุณภาพและความชอบของรสชาติของผู้ที่ทดสอบ บันทึกเป็นระดับคะแนนดังนี้ คือ

คะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

คะแนน 2 = ไม่ชอบมาก

คะแนน 3 = ไม่ชอบปานกลาง

คะแนน 4 = ไม่ชอบ

คะแนน 5 = เลขๆ

คะแนน 6 = ชอบ

คะแนน 7 = ชอบปานกลาง

คะแนน 8 = ชอบมาก

คะแนน 9 = ชอบมากที่สุด

8. แอคติวิตีของเอนไซม์ PPO ของเปลือกผล โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Jiang and Fu (1998)

การสกัดเอนไซม์ (enzyme extraction) วิธีการสกัดเอนไซม์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Huang *et al.* (1990) ทำการสกัดภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำเปลือกผลมาใส่ลงในโถรงบดแช่เย็นที่มีสารละลายสกัด (extraction solution) ในอัตราส่วนน้ำหนักของเปลือกผลต่อปริมาตรสารละลายสกัดเท่ากับ 1 : 4 ซึ่งสารละลายสกัดประกอบด้วยสารละลาย 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.2), 1 M KCl และ 2 เปอร์เซ็นต์ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) เมื่อบดเข้ากันดีแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ PPO

การวิเคราะห์เอนไซม์ PPO ดัดแปลงจากวิธีการของ Jiang and Fu (1998) โดยการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) และ 0.20 M catechol 0.20 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารวิเคราะห์ดังกล่าวผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำ crude enzyme ที่เจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดทดสอบที่มี alkaline copper solution (สารละลายนี้ประกอบด้วย 4 % Na_2CO_3 : 0.20 N NaOH : 1 เปอร์เซ็นต์ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 2 เปอร์เซ็นต์ potassium tartrate ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 50 เปอร์เซ็นต์ Folin – Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบดังกล่าว ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยปริมาณโปรตีนที่เทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (ภาพภาคผนวก 2) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำหนักเปลือกผลสด ตามสูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณโปรตีน (mg/g fresh weight) = 12.5 Y

กำหนดให้ Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แอคติวิตีของเอนไซม์มีหน่วยย่อยเป็น หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน (unit/mg protein) ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรทให้เป็นผลผลิต โดยทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น 0.01 หน่วยต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่เดือน มิถุนายน 2547 ถึง สิงหาคม 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved