

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาในการให้โอโซนที่เหมาะสมต่อการควบคุมการเกิดโรคของผลลำไย

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผล

ดังแสดงจาก ค่า L^* (ภาพ 5) และ ค่า b^* (ภาพ 7) ซึ่งเป็นดัชนีในการวัดระดับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผล การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผล พบว่าการรมโอโซนเป็นเวลา 30, 60, 120 นาที สามารถชะลอการเปลี่ยนสีเปลือกนอก อาจเนื่องจากโอโซนสามารถเข้าไปฟอกสีเปลือกด้านนอกให้มีสีอ่อนลง โดยค่า L^* และค่า b^* มีค่ามากกว่าชุดควบคุม และคงสภาพของสีผิวเปลือกนอกของลำไยได้ในระยะหนึ่ง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Liew และ Prange (1994) ที่ได้ศึกษาผลของโอโซน ที่ความเข้มข้น 0, 7.5, 15, 30 หรือ 60 ไมโครลิตรต่อลิตร ทุกวันๆ ละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 28 วัน พบว่า แครอทที่ผ่านการรมด้วยโอโซนมีสีสว่างกว่าที่ไม่ได้รม ซึ่งการฟอกสีของโอโซน น่าเป็นผลจากคุณสมบัติการเป็นตัวออกซิไดซ์ของโอโซนที่สามารถเข้าไปทำลายเอนไซม์ PPO ทำให้การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเปลือกช้าลง (ชมภูศักดิ์และเทพนม, 2540) แต่หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้นการเปลี่ยนสีเปลือกไม่แตกต่างกัน เนื่องจากรงควัตถุส่วนใหญ่ภายในพืช มีโครงสร้างที่ไม่ค่อยเสถียร ทำให้โครงสร้างและสีเปลี่ยนแปลงได้ง่าย (จริงแท้, 2544) เช่นเดียวกับการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ถ้าความเข้มข้นสูงสามารถฟอกสีให้จางลงเป็นระยะเวลานาน แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำเกินไปสีของรงควัตถุอาจกลับคืนได้

ดังนั้นการใช้โอโซนในระยะเวลาที่เหมาะสมสามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกได้ ซึ่งจากการสังเกต พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกด้านนอกจะสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกด้านใน แต่การรมโอโซนในระยะเวลาสั้นเกินไปอาจจะมีผลให้เปลือกชั้นนอกของผลลำไยได้รับความเสียหายและจุลินทรีย์สามารถเข้าทำลายถึงภายในของผลได้ ทำให้ไม่สามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลในเปลือกชั้นในได้ อีกทั้งยังเกิดจากการเกี่ยวข้องกับการสูญเสียน้ำ การเสื่อมสภาพของผลด้วย (Jiang, 1999 ; Jiang *et al.*, 2002)

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids ; TSS)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด พบว่า ก๊าซโอโซนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด เนื่องจากตามธรรมชาติลำไยเป็นผลไม้ที่บ่มไม่สุก (non-climacteric) เมื่อทำการเก็บเกี่ยวผลลำไยจะมีการหายใจลดลงมาก และจะหยุดการสร้างน้ำตาล

(คณัย, 2535) จึงทำให้ผลลำไยที่เก็บรักษาไว้มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง ดังในชุดที่ผ่านการรมก๊าซโอโซนที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาที

3. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ พบว่า ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อมีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง ในชุดที่รมก๊าซโอโซนเป็นระยะเวลา 15 และ 30 นาที มีค่าลดลง อาจเกิดเนื่องจากการเสื่อมสภาพของ middle lamella ซึ่งมี pectin เป็นองค์ประกอบสำคัญ (คณัยและนิธิยา 2542) โดยการทำงานของเอนไซม์ (คณัย, 2540) และพบว่าชุดที่รมโอโซนมีแนวโน้มทำให้ค่าความแน่นเนื้อของลำไยลดลงมากกว่าชุดที่ไม่ได้รมโอโซน อาจเนื่องจากเชื้อราที่เข้าทำลายผลสามารถปล่อยเอนไซม์เพื่อย่อยและสลายเนื้อผลได้ มีรายงานว่าเชื้อรา *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cineria*, *Rhizopus rolfsii* สามารถสร้างเอนไซม์ polygalacturonase ได้ (Horton and Keen, 1966)

4. การเกิดโรค

เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ผลลำไยพบเชื้อราในทุกชุดการทดลองซึ่งจะเริ่มปรากฏเชื้อราในวันที่ 2 โดยจะพบเชื้อราบริเวณที่ขั้วผล หลังจากนั้นจะลุกลามไปทั่วทั้งผลภายใน 4-5 วัน ซึ่งผลลำไยที่ไม่ได้รมก๊าซโอโซน(ชุดควบคุม) พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด การรมด้วยก๊าซโอโซนทุกระยะเวลาสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าชุดที่ไม่ได้รม จากผลการทดลองพบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการรมโอโซนคือ 60 นาที โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุดเนื่องจากสาเหตุต่างๆ ที่โอโซนมีผลต่อการทำลายเชื้อรา โดยอาจมีผลในการออกซิไดซ์เซลล์เมมเบรนของเชื้อราให้ได้รับความเสียหายหรือโอโซนอาจกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคโดยการสร้างสารที่เรียกว่า phytoalexin เช่นจากการทดลองของ Sarig *et al.* (1996) พบว่าหลังจากได้รับโอโซนจะมีการสร้างสาร reversital และ pterostilbene ทำให้การเข้าทำลายของเชื้อเกิดขึ้นน้อย แต่ถ้าหากรมโอโซนในเวลา 15 หรือ 30 นาที อาจเป็นเวลาที่น้อยเกินไปที่จะสามารถทำลายเชื้อราที่อยู่บริเวณผิวเปลือกผลลำไยได้หมด และการรมโอโซนที่ระยะเวลา 120 นาทีพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากกว่า 60 นาที อาจเนื่องจากที่ระยะเวลา 120 นาทีเป็นเวลาในการรมโอโซนมากเกินไปทำให้เปลือกผลลำไยเกิดความเสียหายขึ้นเนื่องจากโครงสร้างเปลือกลำไยเมื่อถูกฉายไต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าชั้น cuticle ที่ผิวเปลือกด้านนอกมีลักษณะบางและซ้อนทับกันไปมา และส่วนมากเป็นเซลล์แบบ stone cell และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ parenchyma ใหญ่ (Jiang *et al.*, 2002) ทำให้เชื้อราสามารถแทรกเส้นใยเข้าไป และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับ

การศึกษารังนี้ จากการสังเกตเนื้อเยื่อของเปลือกผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบรอยแตกที่ผิว exocarp ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เชื้อราเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อด้านในได้มากขึ้น นอกจากนี้การทดลองของ สิริริยา (2545) รายงานว่า การใช้โอโซนที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้ผิวเปลือกของลำไยแตกยุ่ย จึงทำให้ความต้านทานต่อโรคลดลง ทำให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้มากขึ้น จึงควรใช้เวลาที่เหมาะสมที่สุดในการรมโอโซนเพื่อชะลอการเกิดโรคของผลลำไย

5. การตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการ total plate count

จากการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการ total plate count การรมด้วยก๊าซโอโซน ที่ระยะเวลา 60 และ 120 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับการทดลองใน อุ่นพบว่า การให้โอโซนทำให้จำนวน colony forming unit (CFU) ที่ผิวมีจำนวนลดลง (Sarig *et al.*, 1996) ซึ่งโอโซนมีคุณสมบัติในการควบคุมการเน่าเสีย เนื่องจากเป็นคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิไดซ์เข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่อยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ (Hunt and Marinas, 1999) และอีกลักษณะคือ อนุมูลตัวกลางอิสระ (free radical-mediated) เป็นตัวเข้าทำลาย การเข้าทำลายของโอโซนมีผลต่อเซลล์เมมเบรน ไซโตพลาสซึม โปรตีน และชั้นของไขมันในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนในเซลล์จับตัวกันเป็นก้อน เซลล์แตก (cell lysis) (Scott and Lesher, 1963) เช่นเดียวกับ Mudd *et al.*, (1969) รายงานว่าโอโซนมีผลต่อการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของสาร phospholipid และ Ishizaki *et al.*, (1987) พบว่าโอโซนมีการซึมผ่านผนังเซลล์ แล้วทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ใน cytoplasm ทำให้แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์ลดลง

การทดลองที่ 2 ผลของโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อของเปลือกผลลำไยภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

จากการศึกษาผิวเปลือกลำไยที่ไม่ได้ผ่านการรมโอโซนพบเส้นใยของเชื้อราปกคลุมจำนวนมากบนเปลือกผลที่มีลักษณะของเปลือกที่ขรุขระ และพบกลุ่มของ epidermal hairs ที่ชั้น exocarp เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jaitrong *et al.* (2005) จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อของเปลือกผลลำไยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope) หลังจากได้รับโอโซนพบว่า เปลือกผลที่ไม่ได้รมด้วยโอโซนมีลักษณะของโครงสร้างที่ประกอบด้วยชั้นของเนื้อเยื่อต่างๆ ดังการศึกษาของ Jiang *et al.* (2002) พบว่าลักษณะผิวเปลือกลำไยประกอบด้วยชั้นต่างๆ คือ ชั้นของ epicarp มี cuticle ต่อเชื่อมกัน และเป็น epidermis ที่เรียงตัวเดี่ยวๆ ชั้นเดียว (uniseriate epidermis) มี subepidermis เป็นเนื้อเยื่อ sclerenchyma ส่วนชั้น middle mesocarp เป็นเนื้อเยื่อ parenchyma เป็นส่วนใหญ่ และเนื้อเยื่อชั้น inner endocarp มีลักษณะของเซลล์ที่เล็ก และมี

ผนังเซลล์บาง ส่วนผลลำไยที่ผ่านการรมโอโซนที่ระยะเวลา 60 นาที มีลักษณะของ epidermal hairs คล้ายกับของ epidermal hairs ที่ไม่ได้ผ่านการรมโอโซน แต่พบการแตกหักเล็กน้อยบางส่วน และพบเส้นใยเชื้อราอย่างมาก ส่วนผลลำไยที่ผ่านการรมโอโซนที่ระยะเวลานานขึ้นคือ 120 นาที พบผิวเปลือกลำไยมีรอยแตกเสียหายกระจายทั่วไป และลักษณะของ epidermal hairs มีรูปร่างผิดปกติโดยมีบางส่วนหักงอ อาจเนื่องจากที่ระยะเวลา 120 นาที เป็นเวลาในการรมโอโซนมากเกินไป ทำให้เซลล์มีความอ่อนแอเนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิไดซ์ของก๊าซโอโซน (ชมพุสศักดิ์และเทพนม, 2540) อาจทำให้ cuticle และเซลล์ถูกออกซิไดซ์และได้รับความเสียหาย จึงทำให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าทำลายได้ง่าย เช่นเดียวกับการทดลองของ สิริริยา (2545) รายงานว่า การใช้โอโซนที่ระยะเวลา 90 นาที จะทำให้ผิวเปลือกของลำไยแตกยุ่ย ทำให้เปลือกผลลำไยเกิดความเสียหายขึ้นได้

การทดลองที่ 3 ผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์บางชนิดต่อการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลลำไย

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผลและการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลโดยประเมินด้วยสายตา

การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผลจากการแช่กรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด คือ กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก และกรดออกซาลิกที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการแช่กรดเป็นเวลา 5 นาที ค่า L^* และค่า b^* มีค่ามากกว่าชุดควบคุม ซึ่งผลลำไยที่แช่ด้วยกรดออกซาลิกมีค่า L^* และค่า b^* มากกว่ากรดซิตริกและกรดแอสคอร์บิก และระดับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลที่แช่กรดออกซาลิกมีค่าน้อยมากที่สุด เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ในผลลำไยที่แช่กรดแอสคอร์บิกมีระดับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลมากกว่ากรดชนิดอื่นๆ

ซึ่งกรดออกซาลิกเป็นสารยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีคุณสมบัติเป็น chelating agent ดังในการศึกษาของ Yang *et al.* (2000) และ Son *et al.* (2000) พบว่า กรดออกซาลิกเข้าจับกับทองแดงซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ PPO มีผลทำให้ complex ระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกเตอร์ถูกเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ทำงานไม่ได้หรือทำงานช้าลง และ Son *et al.* (2001) พบว่าการแช่เนื้อผลแอปเปิ้ลพันธุ์ Liberty ในสารละลายกรดออกซาลิก 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดชนิดอื่นๆ ในกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยเป็นสารละลายกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่ากรดซิตริกและกรดแอสคอร์บิก (ตาราง 9) จึงมีผลทำให้สารละลายภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อเปลือกต่ำลง ซึ่งมีผลยับยั้งเอนไซม์ PPO เนื่องจากเอนไซม์ PPO มีค่า pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.0 จึงสามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดสีน้ำตาลได้ดี (Jiang and Fu 1998 ; Martinez

et al., 2001) นอกจากนี้กรดออกซาลิกยังมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่ดีป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีผลทำให้ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ (Kayashima and Katayama, 2002 ; Faria, 1964) ดังการศึกษาของ Yang *et al.* (2000) พบว่า กรดออกซาลิกสามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในผลแอปเปิลและสาลี่ของจีนเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.019 และ 0.017 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนกรดซิตริกสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้รองลงมาจากกรดออกซาลิก ซึ่งกรดซิตริกอยู่ในกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกับกรดออกซาลิก (Son *et al.*, 2001) และยังมีคุณสมบัติเป็น acidulant โดยมีผลลด pH ของสายละลาย ซึ่งอาจทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ให้เสียสภาพได้ ดังการศึกษาในผลล้นจีพันธุ์ค่อม พบว่า กรดซิตริกความเข้มข้น 1.0 M สามารถควบคุมการเกิดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี (อุไรวรรณ, 2543) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jiang and Fu (1998) พบว่าเมื่อใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 100 mM กับผลล้นจีพันธุ์ Huaizhi ให้ผลควบคุมการเกิดสีน้ำตาลได้ดี และการศึกษาในฝรั่งพันธุ์กลมสาลี่ กรดซิตริกความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลได้ (สนธยา, 2546)

เนื่องจากกรดซิตริกยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO โดยทำหน้าที่เป็น chelating agent โดยการจับกับโลหะทองแดง ซึ่งเป็น prosthetic group ของเอนไซม์ PPO ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับซับสเตรตได้

กรดแอสคอร์บิกสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้น้อยที่สุด จากกรดทั้ง 3 ชนิด แต่ยังสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ เนื่องจากกรดแอสคอร์บิกมีคุณสมบัติเป็น reducing agent โดยทำการรีดิวซ์สาร *o*-quinone ให้เปลี่ยนกลับไปเป็นสาร diphenols ก่อนทำปฏิกิริยาไปเป็นสารประกอบสีน้ำตาล (Walker, 1997) และยังเป็น antioxidant ซึ่งไปยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (รัชนี, 2535) โดยจะถ่ายเทไฮโดรเจนอะตอมให้กับออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เร่งโดยเอนไซม์ PPO จึงไม่สามารถเกิดสีน้ำตาลได้ (นิธิยา, 2539) ซึ่งการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของกรดแอสคอร์บิกน้อยกว่ากรดออกซาลิกและกรดซิตริก เนื่องจากค่าการแตกตัวของกรดแอสคอร์บิกเมื่อละลายน้ำมีค่าต่ำ จึงแสดงความเป็นกรดต่ำ (ตาราง 9) ทำให้สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลต่ำด้วย ซึ่งแตกต่างออกไปตามชนิดของพืช ดังการศึกษาของ พรอนันต์ (2545) โดยศึกษาในผลล้นจีพันธุ์สงฮวย พบว่า กรดแอสคอร์บิก 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลที่เปลือกผลได้ เช่นเดียวกับ Kahn (1977) พบว่าผลอะโวคาโดพันธุ์ Fuerte และ Lerman มีการเกิดสีน้ำตาลลดลงเมื่อใช้กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น 1.0 mM และในผลแอปเปิลพันธุ์ Liberty กรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถป้องกันการเกิดสีน้ำตาลได้ (Son *et al.*, 2001)

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solids ; TSS)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในผลลำไยที่แช่กรดอินทรีย์ 3 ชนิด ในแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน และมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ตลอดอายุการเก็บรักษา โดยมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากอาจเกิดจากการที่เนื้อผลมีการนำน้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหายใจในขณะที่เกิดการเสื่อมสภาพของผล (Nagar, 1994) โดยการแช่กรดทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อปริมาณ TSS อาจเกิดจากกรดอินทรีย์ที่แช่ผลลำไยไม่สามารถซึมผ่านเปลือกผลเข้าไปถึงเนื้อเยื่อของ mesocarp ได้

3. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ไม่สามารถซึมผ่านเปลือกผลเข้าไปถึงเนื้อเยื่อของ mesocarp ได้ แต่การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อมีแนวโน้มลดลง เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ดังในผลลำไยที่แช่ด้วยกรดซิตริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มีค่าลดลง อาจเกิดเนื่องจากการเสื่อมสภาพของ middle lamella ซึ่งมี pectin เป็นองค์ประกอบสำคัญ (दनัยและรัตน์, 2542)

4. การเกิดโรค

ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าการใช้กรดอินทรีย์ต่างๆ ให้ผลดีในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกได้ดี แต่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้น้อย น่าจะเป็นสาเหตุจากการแช่ผลในสารละลายทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำสามารถเข้าทำลายบริเวณขั้วผลได้ดังการรายงานของวิชาและคณะ (2545) พบว่า การใช้กรดอินทรีย์เช่น formic acid, ascorbic acid และ citric acid มีแนวโน้มใช้ทดแทนการรมด้วยก๊าซ SO_2 โดยพบว่า การใช้ formic acid 5 เปอร์เซ็นต์ช่วยควบคุมโรคได้ดีที่สุด แต่ทำให้สีผิวลำไยคล้ำ ส่วน ascorbic acid และ citric acid สามารถควบคุมโรคให้ผลรองลงมาแต่ให้ผลในการฟอกสีผิวดีกว่าโดยใกล้เคียงกับผลลำไยสดที่รมด้วยก๊าซ SO_2 ซึ่งการรมผลลำไยสดด้วยก๊าซ SO_2 สามารถเก็บรักษาได้นาน 40-50 วัน โดยพบการเกิดโรคน้อยมาก และสีผิวเปลือกยังคงมีสีเหลือง ในขณะที่การแช่กรดสามารถช่วยชะลอการเกิดสีน้ำตาลได้ แต่ควบคุมการเกิดโรคได้น้อย ดังนั้นจึงนำวิธีการให้โอโซนมาใช้ร่วมด้วยเพื่อมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดียิ่งขึ้น

การทดลองที่ 4 ผลของโอโซนร่วมกับกรดอินทรีย์บางชนิดต่อคุณภาพและแอคติวิตีเอนไซม์ PPO ของผลลำไย

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผลและการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดสีน้ำตาลของเปลือกผลโดยประเมินด้วยสายตา

การเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกผล เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ค่า L^* ของทุกชุดการทดลอง มีแนวโน้มลดลง ซึ่งชุดที่ผ่านการแช่กรดออกซาลิก 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วรมด้วยก๊าซโอโซน 60 นาที มีค่า L^* และค่า b^* มากที่สุด รองลงมาคือชุดที่ผ่านการแช่กรดซิตริกและกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์แล้วรมก๊าซโอโซน 60 นาที เช่นเดียวกับการประเมินการเกิดสีน้ำตาลด้วยสายตา ซึ่งกรดออกซาลิกมีคุณสมบัติเป็น chelating agent จะเข้าจับกับทองแดงซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ PPO มีผลทำให้ complex ระหว่างเอนไซม์กับโคแฟกเตอร์ถูกเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ทำงานไม่ได้หรือทำงานช้าลง (Yang *et al.*, 2000 ; Son *et al.*, 2000) อีกทั้งกรดออกซาลิกยังมียคุณสมบัติเป็น acidulant ที่ดี (Faria, 1964) จึงทำให้เอนไซม์ PPO ทำงานไม่ได้ ทำให้สามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลได้มากกว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับ ฉัตรนภา (2547) ซึ่งศึกษาในเนื้อผลฝรั่งพันธุ์กลมสาส์ที่ตัดแบ่งชิ้น พบว่ากรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลได้ดีที่สุด นอกจากนี้กรดออกซาลิกยังมียคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่ดีสามารถป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่ให้เกิดขึ้น (Kayashima and Katayama, 2002) และยังพบว่ากรดออกซาลิก มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ชนิด competitive inhibitor ของเอนไซม์ PPO (Son *et al.*, 2000) จึงมีผลยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ ส่วนระดับการเกิดสีน้ำตาล จากการศึกษาค้นคว้านี้พบว่า ผลลำไยหลังจากแช่กรดซิตริกมีระดับการเกิดสีน้ำตาลรองลงมาจากการแช่กรดออกซาลิก เนื่องจากกรดซิตริกเป็นกรดที่อยู่ในกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกับกรดออกซาลิก (Son *et al.*, 2001) ซึ่งกรดซิตริกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO โดยการจับกับโลหะทองแดง ส่งผลให้ยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้ ดังการศึกษาของ Yang *et al.* (2000) พบว่า การใช้กรดซิตริกความเข้มข้น 3.20 กรัมต่อลิตร ในผลส้มของจีนสามารถลดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลได้ ในขณะที่การแช่ด้วยกรดแอสคอร์บิกตามด้วยการรมด้วยโอโซน และชุดควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงของเปลือกเป็น สีน้ำตาลมากขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 สัปดาห์ เนื่องมาจากค่าการแตกตัวของกรดแอสคอร์บิกเมื่อละลายน้ำมีค่าต่ำ จึงแสดงความเป็นกรดต่ำ ทำให้สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลต่ำด้วย (Walker, 1997)

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ทั้งหมด (total soluble solids : TSS)

จากการศึกษาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของเนื้อผลลำไยที่แช่กรดอินทรีย์แล้วรมก๊าซโอโซน 60 นาที ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงในทุกชุดการทดลอง และมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเนื่องจากเมื่อมีอายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เนื้อผลมีการนำน้ำตาลไปใช้ในกระบวนการหายใจ ในขณะที่เกิดการเสื่อมสภาพของผล (Nagar, 1994) ซึ่งโดยทั่วไปการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลอกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยเฉพาะกระบวนการหายใจ ซึ่งอาศัยน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นหลัก จึงมีการนำสารตั้งต้นไปใช้ลดลง (Paull and Chen, 1987) ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

3. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของผลลำไยของทุกชุดการทดลองที่เก็บรักษาเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง ดังในชุดที่ผ่านการแช่กรดซิตริกแล้วรมก๊าซโอโซน 60 นาที และชุดควบคุมมีค่าความแน่นเนื้อต่ำ ส่วนชุดที่แช่ด้วยกรดออกซาลิกแล้วตามด้วยการรมด้วยโอโซนมีความแน่นเนื้อสูงที่สุด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมไปลดการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งการสลายองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ ได้แก่ polygalacturonases (PG), cellulase และ pectinesterase (PE) เป็นต้น ทำให้ความแน่นเนื้อของผลลำไยลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (จริงแท้, 2544)

4. การเกิดโรคและการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการทำ total plate count

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงการเก็บรักษา 1-2 สัปดาห์แรกไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุมและชุดที่แช่กรดอินทรีย์ร่วมกับโอโซน เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ให้ต่ำลง (Lichter *et al.*, 2000) ทำให้เปลือกผลลดการเข้าทำลายของโรค ดังการศึกษาในผลอะโวคาโดพันธุ์ Hass พบว่า การเก็บรักษาผลที่อุณหภูมิ 6-8 องศาเซลเซียส มีการเกิดโรคลดลงต่ำกว่าผลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Woolf *et al.*, 2003) แต่ในสัปดาห์ที่ 3 เริ่มปรากฏเชื้อราในทุกชุดการทดลอง โดยชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด

ในขณะที่การแช่กรดอินทรีย์ต่างๆ ตามด้วยการรมด้วยโอโซนสามารถควบคุมการเกิดโรค และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ชุดการทดลองที่แช่ด้วยกรด

แอสคอร์บิกมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ชุดที่แช่ด้วยกรดซิตริก และกรดออกซาลิกยังคงมีค่าค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากกรดมีประสิทธิภาพสูงในการลด pH ของสารละลายให้ต่ำลงมาก จึงมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ให้ลดต่ำลง เมื่อเก็บรักษานานขึ้นชุดการทดลองที่แช่ด้วยกรดซิตริกตามด้วยการรมโอโซนมีค่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากการเข้าทำลายซ้ำของเชื้อ และประสิทธิภาพของโอโซนในการควบคุมเชื้อขึ้นอยู่กับความสามารถในการแทรกซึมผ่านเข้าไปที่ผิวเปลือกของผลลำไย ในขณะที่การแช่ด้วยกรดออกซาลิกตามด้วยการรมโอโซนสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้นาน 3 สัปดาห์ โดยมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยมาก เป็นเพราะผลของโอโซนในการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา สอดคล้องกับการทดลองของ Spotts and Cervantes (1992) พบว่าการรมด้วยโอโซนเป็นเวลา 1-5 นาทีสามารถยับยั้งการเกิดสปอร์ของ *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* และ *Penicillium expansum* ได้ดีที่สุดและมีผลในการควบคุมการเน่าเสียของผลองุ่น (*Vitis vinifera* L.) ที่เกิดจากเชื้อ *Rhizopus stolonifer* หลังการเก็บเกี่ยว โดยทำให้จำนวน colony forming units (CFU) ของเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียที่ผิวของผลองุ่นลดลง (Sarig *et al.*, 1996) ส่วนในแตงกวาพบว่า สามารถควบคุมเชื้อราแป้ง โดยลดการงอกของสปอร์ *Sphaerotheca fuliginea* (Khan *et al.*, 1999) และสามารถควบคุมเชื้อรา *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerera*, *Mucor piriformis* และ *Penicillium expansum* บนผิวของท้อพันธุ์ Elegant ได้ นอกจากนี้การใช้โอโซนร่วมกับกรดออกซาลิกทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดียิ่งขึ้นเนื่องจากความเป็นกรดของกรดออกซาลิกที่มีค่าต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับกรดชนิดอื่นๆ

5. การประเมินคุณภาพการบริโภค

จากการประเมินคุณภาพด้านการบริโภค พบว่า หลังจากแช่กรดอินทรีย์ทุกชนิดแล้วรวมก๊าซโอโซน 60 นาทีแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีคุณภาพด้านการบริโภคที่ยังยอมรับอยู่ คือ พอใจในรสชาติ กลิ่น ลักษณะของเนื้อผล สันนิษฐานว่า อุณหภูมิต่ำช่วยชะลอกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ทำให้การสลายตัวของกลิ่นเกิดอย่างช้าๆ ดังการศึกษาในผลมะเขือเทศพันธุ์ Sunbean พบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส มีผลต่อองค์ประกอบหลักของกลิ่น โดยมีค่าลดลงภายหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 14 วัน (McDonald *et al.*, 1999) และอุณหภูมิต่ำช่วยลดอัตราการหายใจให้ต่ำลงและมีผลโดยตรงกับสับสเตรทของการหายใจ ได้แก่ น้ำตาล ทำให้เกิดการสลายตัวอย่างช้าๆ (จริงแท้, 2544) จึงทำให้มีรสชาติที่ยังยอมรับได้ และเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้นเป็น 3 สัปดาห์ คุณภาพด้านการบริโภคมีแนวโน้มลดลง โดยชุดควบคุมมีการลดลงมาก

ที่สุด ซึ่งไม่สามารถยอมรับจากผู้บริโภคได้ เนื่องจากเริ่มปรากฏของเชื้อราจึงไม่สามารถยอมรับจากผู้บริโภคได้

6. แอคติวิตีของเอนไซม์ PPO ของเปลือกผล

การเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) ในเปลือกผลลำไย หลังจากแช่กรดอินทรีย์แล้วรวมก๊าซโอโซน 60 นาที มีแอคติวิตีของเอนไซม์ PPO ต่ำกว่าชุดควบคุม เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ PPO มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ในชุดที่แช่กรดออกซาลิกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วรวมก๊าซโอโซน 60 นาที ยังคงมีค่าต่ำกว่าชุดอื่นๆ ทั้งนี้ เนื่องจากการออกซาลิกไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO โดยทำหน้าที่เป็น chelating agent ที่มีประสิทธิภาพสูงในการรวมตัวเป็น complex กับไอออนของโลหะทองแดง ซึ่งเป็น prosthetic group ของเอนไซม์ PPO โดยการรีดิวซ์ Cu^{2+} ของเอนไซม์ PPO ให้เปลี่ยนเป็น Cu^+ จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถรวมตัวกับสับสเตรตได้ ส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (Son *et al.*, 2000; Kayashima and Katayama, 2002) ดังการศึกษาในน้ำแอปเปิ้ลและสาลี่ ซึ่งพบว่ากรดออกซาลิกช่วยลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ PPO โดยการลด oxalic acid / Cu^{2+} complex ให้เปลี่ยนเป็น Cu^+ มากขึ้น (Yang *et al.*, 2000) นอกจากนี้กรดออกซาลิกยังมีคุณสมบัติเป็น acidulant ที่ใช้ในการลด pH ของสารละลายในเนื้อเยื่อให้ต่ำลงมากซึ่งทำให้มีความเป็นกรดสูงขึ้นส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์โดยเปลี่ยนแปลงประจุบนหมู่อะมิโนของเอนไซม์ที่มีการเติมไฮโดรเจนไอออนให้กับหมู่ carboxyl ของเอนไซม์ อาจทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีในสภาพนี้หรือเสียสภาพตามธรรมชาติไป ซึ่งมีผลยับยั้งในการเกิดสีน้ำตาล (Faria, 1964) สอดคล้องกับการศึกษาการเกิดสีน้ำตาลในผลลิ้นจี่หลังการเก็บเกี่ยว พบว่า การแช่ในสารละลายกรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 2 และ 4 mM นาน 10 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในเปลือกผลลิ้นจี่ได้ และยังลดการทำงานของเอนไซม์ peroxidase ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Zheng and Tain, 2006) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและความเข้มข้นที่ใช้