

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

มะนาวเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 ให้ผลผลิต 120,141 ตัน มีพันธุ์ที่มีการปลูกกันมากที่สุดได้แก่ พันธุ์แป้น (*Citrus aurantifolia* Swingle) โดยผลผลิตจะออกสู่ตลาดในช่วงเดือนกรกฎาคมจนถึงเดือนสิงหาคม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554) สำหรับมะนาวสายพันธุ์ตาดิติ (*Citrus latifolia* Tan.) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกับมะนาวที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งทำการเก็บเกี่ยวในระยะที่สีเปลือกมีสีเขียวเช่นเดียวกับกับมะนาวพันธุ์แป้น ในปัจจุบันการกำหนดราคาของมะนาวจะขึ้นอยู่กับคุณภาพภายนอกคือสีของเปลือกผล หากสีของเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจะส่งผลให้ราคาตกลง สำหรับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะนาวเกิดขึ้นเร็วมาก โดยมีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ทำให้มีอายุการวางจำหน่ายที่สั้น ส่งผลกระทบต่อราคาของมะนาวทำให้ราคาต่ำลงอย่างมาก การสูญเสียสีเขียวของเปลือกผลมะนาวมีสาเหตุมาจากการสลายตัวของรงควัตถุคลอโรฟิลล์ (*chlorophyll*) โดยกระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ถูกกระตุ้นโดยกิจกรรมเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ได้แก่ *chlorophyllase*, *Mg-chelatase*, *pheophorbide* และ *chlorophyll-degrading peroxidase* เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและหน้าที่ที่แตกต่างกัน โดยทำให้เกิดการทำลายหรือย่อยโครงสร้างของรงควัตถุคลอโรฟิลล์ก่อให้เกิดการสะสมอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น *chlorophyllide*, *pheophytin*, *pheophorbide* และ *C13²-hydroxy chlorophyll* เป็นต้น และสุดท้ายอนุพันธ์เหล่านี้สลายตัวเป็นสารไม่มีสีที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (SriLaong et al., 2011) รายงานของ Schelbert et al. (2009) ได้พบการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ตัวใหม่ในระดับโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์คือ *pheophytinase* หรือ *pheophytin pheophorbide hydrolase*, PPH โดยเอนไซม์ชนิดนี้ไปย่อยอนุพันธ์ *pheophytin* ซึ่งเป็นอนุพันธ์สารตั้งต้นเดียวกันกับการย่อยสลายโดยเอนไซม์ *chlorophyllase* แล้วเกิดการสร้างอนุพันธ์ *pheophorbide* Kaewsuksaeng et al. (2011) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ *pheophytinase* ในมะนาวพันธุ์ตาดิติ (*Citrus latifolia* Tan.) ที่ผ่านการเก็บรักษา พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* มีกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเหลืองของเปลือกมะนาวผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาในบร็อคโคลี่หลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ *pheophytinase* สูง ในขณะที่ดอกย่อยสีเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง (Aiama-or et al., 2012) จากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *pheophytinase* มีบทบาทสำคัญในกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในพืชเช่นเดียวกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบในมะนาวสายพันธุ์ไทยและมะนาวสายพันธุ์ตาดิติ ดังนั้นงานวิจัยนี้

จึงมีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งรูปแบบการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในมะนาว 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ตาฮิติ โดยมุ่งเน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และเอนไซม์ *pheophytinase* เพื่อทราบถึงคุณลักษณะทางเคมีของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ *pheophytinase* และ *chlorophyllase* ที่มีการใช้สารตั้งต้นตัวเดียวกันจะนำมาสู่การเข้าใจกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ในมะนาวของทั้ง 2 สายพันธุ์จากสำหรับการศึกษาวิธีการชะลอการเหลืองของมะนาวที่ผ่านมามีหลายวิธีในการชะลอการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ การใช้ความร้อน การตัดแปลงสภาพบรรยากาศ และวิธีการอื่นๆ

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการสลายตัวของคลอโรฟิลล์และคุณลักษณะของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว

1.3 สมมุติฐาน

- 1.3.1 สายพันธุ์ของมะนาวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและการสลายตัวของคลอโรฟิลล์
- 1.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ รวมทั้งเอนไซม์ชนิดใหม่คือ *pheophytinase* มีกลไกการทำงานแตกต่างกันในมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.4.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษา
- 1.4.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ที่สกัดได้จากเปลือกมะนาวสายพันธุ์แป้น และสายพันธุ์ตาฮิติ โดยใช้ *ammonium sulfate* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0-20 20-40 40-60 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำเอนไซม์บริสุทธิ์ข้างต้นวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบถึงข้อมูลทางกายภาพ และเคมี ของมะนาวสายพันธุ์แป้น และสายพันธุ์ตาฮิติ

1.5.2 เพื่อทราบถึงข้อมูลเบื้องต้น และคุณสมบัติที่มีผลต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase*

บทที่ 2

สำรวจเอกสาร

2.1 มะนาว

มะนาวเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีการปลูกกันทั่วทุกภาคของประเทศไทยให้โดยในปีในปี พ.ศ. 2554 ให้ผลผลิต 120,141 ตัน โดยพันธุ์ที่มีการปลูกกันมากที่สุดได้แก่ แป้น ไข่ ตาอิตี เป็นต้น โดยผลผลิตจะออกสู่ตลาดในช่วงเดือนกรกฎาคมจนถึงสิงหาคม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554) มะนาวเมื่อเก็บเกี่ยวสีเปลือกจะมีสีเขียว โดยราคาของมะนาวจะขึ้นอยู่กับคุณภาพภายนอกคือสีของเปลือกผล การเปลี่ยนแปลงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของมะนาวเกิดขึ้นเร็วมากโดยจะพบการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ส่งผลกระทบต่อราคาของมะนาวทำให้ราคาต่ำลงอย่างมาก การสูญเสียสีเขียวนี้มีสาเหตุมาจากการสลายตัวของรงควัตถุคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)

2.1.1 การแบ่งกลุ่มของมะนาว

มะนาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ มะนาวฝรั่ง หรือเลมอน (*lemon*) และมะนาว (*lime*) เลมอน หรือมะนาวฝรั่ง (*lemon*) *Citrus limon* Burm. f. ในบ้านเราเรียกว่า มะนาวฝรั่ง หรือมะนาวนมนานบ้าง ลักษณะทั่วไป ลำต้นตรงแข็งแรง และกิ่งแผ่เป็นพุ่มมีหนามเรียวยาวสั้น ใบมีสีเขียวอ่อนอมเหลือง ก้านใบมีหูที่ใหญ่กว่าส้มเขียวหวานเล็กน้อย ออกดอกเป็นกลุ่มตลอดปี ผลมีสีเหลืองอมเขียวที่เห็นได้ชัด คือ ส่วนปลายผลมีลักษณะนูน สามารถแบ่งมะนาวฝรั่ง ออกได้ ดังนี้

1. พวกที่มีรสเปรี้ยว (*acid lemon*) ได้แก่ ยูเรก้า ลิสบอน
2. พวกที่มีรสหวาน (*sweet lemon*) รูปร่างคล้ายเลมอนแต่มีรสหวาน
3. อะนอมมอลัส เลมอน (*anomalous lemon*) พันธุ์ที่สำคัญได้แก่ รัฟเลมอน ซึ่งมีถิ่นกำเนิดใน

อินเดีย ผิวขรุขระจุกที่ปลายผลใหญ่ มีเมล็ดมาก

มะนาว (*lime*) *Citrus aurantifolia* Swing เชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดในอินเดีย พม่า ไทยและมาเลเซีย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. มะนาวผลเล็ก (*small-fruited acid lime*) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-4 นิ้ว แต่บางพันธุ์มีผลใหญ่มาก รสเปรี้ยวจัด ผิวละเอียดมีสีเหลืองอมเขียว ได้แก่ มะนาวพื้นบ้าน มะนาวเม็กซิกัน และมะนาวไทย

2. มะนาวผลใหญ่ (*large-fruited acid lime*) ที่สำคัญมี 2 พันธุ์ คือ

- 2.1 ตาอิตี (*Tahiti*) หรือ เปอร์เซีย (*Persian*) ลักษณะต้นไม่สูง แต่จะแตกกิ่งขยายออกเป็นพุ่ม ลำต้นแข็งแรงมาก ใบมีขนาดใหญ่ ตามกิ่งมีหนามน้อยมาก ผลมีขนาดใหญ่กว่ามะนาวทั่วไป แต่ผิวของ มะนาวตาอิตี (*Citrus latifolia* Tan.) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับมะนาวที่ปลูกใน

ประเทศไทย ซึ่งวัยของมะนาวในระยะที่เปลือกยังคงเป็นสีเขียวคือลักษณะที่ต้องการของผู้บริโภคเนื่องจากอุดมไปด้วยสารประกอบหอมระเหยและมีกลิ่นเฉพาะตัว เปลือกของมะนาวตาอิติบางกว่ามะนาวฝรั่ง ลักษณะเด่นคือไม่มีเมล็ด และให้ผลตลอดทั้งปี

2.2 แบริสไลม์ (Bearss lime) มีลักษณะคล้ายพันธุ์ตาอิติตแต่ผลใหญ่กว่า (กองบรรณาธิการบัณฑิต เกษตรอาสา, 2529)

2.2 พันธุ์มะนาว (ศุภกิจ แก้วอนอม, 2540)

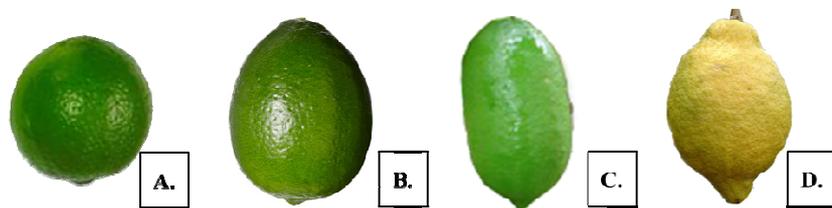
พันธุ์มะนาวในเมืองไทยมีอยู่หลายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากได้แก่

2.2.1 มะนาวแป้น เป็นมะนาวที่ได้จากการเพาะเมล็ดมะนาวพันธุ์พื้นบ้านแล้วมีการกลายพันธุ์ไปจนได้ลักษณะที่ดี เป็นมะนาวพันธุ์ที่คนนิยมปลูกมากที่สุด เพราะให้ผลดกและออกผลตลอดทั้งปี ผลมีขนาดปานกลาง ทรงมนแป้น เปลือกบางใส มีสีเขียวอมเหลือง ไม่ค่อยมีเมล็ด

2.2.2 มะนาวตาอิติต เป็นพันธุ์ที่นำมาจากหมู่เกาะตาอิติต เป็นมะนาวที่ไม่ตรงกับรสนิยมของคนไทย แต่มีข้อดีคือทนแล้งและติดผลได้ดีตลอดทั้งปี ผลโตเปลือกหนา เมื่อแก่จัดผลยังเป็นสีเขียวเข้ม มีน้ำมาก เพราะในผลของมะนาวพันธุ์นี้ไม่มีเมล็ดอยู่เลย ดังนั้นการขยายพันธุ์จึงต้องใช้วิธีการตอนกิ่งและติดตาเท่านั้น มะนาวพันธุ์นี้มีราคาสูง จึงปลูกไว้เพื่อใช้ในยามที่มะนาวขาดตลาด

2.2.3 มะนาวหนัง เป็นมะนาวที่ปลูกกันทั่วไป มีลักษณะผลใหญ่ ผลอ่อนมีลักษณะกลมรีหัวท้ายแหลมเมื่อโตขึ้นผลจะค่อยๆ สั้นเข้าและหัวท้ายจะมนเข้า เมื่อผลโตเต็มที่จะมีลักษณะกลมค่อนข้างยาว ด้านหัวมีจุดเล็กๆ ผิวเรียบ เปลือกค่อนข้างหนา จึงทำให้เก็บรักษาผลไว้ได้นาน มะนาวหนังมีรสชาติเปรี้ยวจัด เพราะมีเปอร์เซ็นต์กรดค่อนข้างสูง มีน้ำมาก

2.2.4 มะนาวพม่า ผลมีลักษณะผลกลมโตเกือบเท่าส้มเขียวหวานเมื่อผลเจริญเต็มที่กินผลย่อยแหลมเปลือกหนาและผิวหยาบ รสชาติเปรี้ยวแต่ไม่ค่อยมีกลิ่น จึงไม่นิยมปลูกกันมากนัก



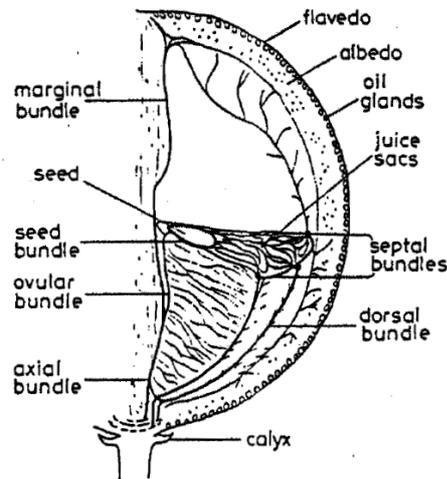
รูปที่ 2.1 พันธุ์มะนาว (A.) มะนาวแป้น, (B.) มะนาวตาอิติต, (C.) มะนาวหนัง และ (D.) มะนาวพม่า

2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะนาว

มะนาวเป็นผลไม้ชนิด *non-climacteric fruit* ซึ่งมีอัตราการหายใจและสังเคราะห์เอทิลีนค่อนข้างคงที่ ในระหว่างการแก่จนถึงสุก (สายชล เกตุษา, 2528) มะนาวจึงจัดเป็นผลไม้ที่มีอัตราการหายใจ การสังเคราะห์เอทิลีนต่ำ (Kader et.al., 1992) ดังนั้นปัญหาสำคัญที่ทำให้มะนาวมีอายุหลังการเก็บเกี่ยวสั้น คือ การคายน้ำซึ่งทำให้ผลเหี่ยว สีเปลือกเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลืองและน้ำตาลภายใน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อผลผลิตที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำจะมีอัตราการหายใจและสังเคราะห์เอทิลีนเพิ่มขึ้น ทำให้ผลผลิตมีการใช้อาหารสะสมในกระบวนการหายใจ และปริมาณเอทิลีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เอทิลีนไปเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสุกและเสื่อมสภาพของผล เช่น *chlorophyllase* ในการสลายคลอโรฟิลล์และ *pectinmethylesterase* ในการนิ่มของผล เป็นต้น (นิภา คุณทรงเกียรติ, 2541) นอกจากนี้ผลมะนาวมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (*Total Soluble Solids: TSS*) และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (*Titratable acidity: TA*) เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณวิตามินซีในผลผลิตจะมีการลดลงภายหลังการเก็บเกี่ยว (นิภา คุณทรงเกียรติ และคณะ, 2531)

2.4 โครงสร้างของผลมะนาว

ผลมะนาวประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่สามารถแบ่งได้เป็นชั้นต่างๆ คือ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลางและกลีบผล (รูปที่ 2.2) ในส่วนชั้นแรกเป็นชั้นของ *epicarp* ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสีเขียวเปลือก (*flavedo*) ที่มีคลอโรฟิลล์และสารสีอื่นๆ ส่วนนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น คือชั้นนอกสุด (*epidermis*) ที่ผิวของชั้นนี้มี *chitin* และซีฟิ่งเคลือบอยู่เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ถัดมาคือ ชั้น *collenchyma* และ *parenchyma* ซึ่งมี *chromatophores* และต่อมน้ำมันระเหย (*oil gland*) อยู่ชั้นที่สอง *mesocarp* หรือ *albedo* ประกอบด้วยเซลล์ที่อยู่กันอย่างหลวมๆ ไม่มี *chromatophores* เนื้อเยื่อชั้นนี้มีลักษณะนุ่มและมีสีขาวตามธรรมชาติ เนื่องจากมีช่องว่างในอากาศจำนวนมาก ภายในเนื้อเยื่อ *albedo* ประกอบด้วยเซลล์ *parenchyma* ขนาดใหญ่ที่มีสาร *pectin* และ *hemicellulose* ห่อหุ้มส่วนของ *endocarp* ซึ่งเป็นส่วนที่รับประทานส่วนเปลือก (*pericarp*) เป็นส่วนที่รวม *albedo* และ *flavedo* และชั้นที่สาม คือชั้น *endocarp* ประกอบด้วยกลีบผล 9-13 กลีบ แต่ละกลีบถูกแบ่งออกจากกันด้วยผนังกลีบ (*segment membrane*) ที่ภายในมีถุงน้ำ (*juice vesicles*) ซึ่งติดกับผนังกลีบด้านนอก (*vesicle stalk*) มีอยู่เป็นจำนวนมากและมีเมล็ดอยู่ที่แกนกลางของผล (Ting and Attaway, 1980; Ting and Rouseff, 1986) มะนาวให้ผลผลิตตลอดทั้งปีแต่ผลผลิตมีน้อยในช่วงหน้าแล้ง (กุมภาพันธ์ – พฤษภาคม) ดัชนีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5 – 5.5 เดือนหลังดอกบาน โดยสังเกตได้ว่าผิวผลมะนาวจะมีสีเขียวเข้ม เป็นมันวาว และการเลือกเก็บเกี่ยวผลมะนาวให้มีชีวิต ไม่มีรอยแผลและรอยขีด (จริงแท้ ศิริพานิช, 2538) จะช่วยให้มะนาวมีอายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายวิภาคของพืชตระกูลส้ม

ที่มา : Spiegle-Roy and Goldschmidt (1996)

2.5 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของผลไม้

ผลผลิตภายหลังการเก็บเกี่ยวมาแล้วยังคงมีชีวิตอยู่ กระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การหายใจ การคายน้ำ การสุก การอ่อนตัวของเนื้อเยื่อ และการสูญเสียคลอโรฟิลล์ เป็นต้น ยังคงดำเนินต่อไปซึ่งมีความสำคัญต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลิตผล (दनัย บุญเกียรติ และ นิธิยา รัตนานนท์, 2546) การสูญเสียสีเขียวและการเกิดสีเหลืองโดยเฉพาะส่วนเปลือก และส่วนต่างๆ ของผลิตผลที่เก็บเกี่ยวมา บ่งบอกถึงการเสื่อมสภาพของผลิตผล ซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดขึ้น โดยเฉพาะในผลิตผลที่ชี้สีของเปลือกเป็นดัชนีในการจำหน่าย กระบวนการเหล่านี้จะเกิดขึ้นช้าหรือเร็วขึ้นกับ ชนิด อายุ ของผลิตผลและสภาพแวดล้อมในระหว่างการเก็บรักษา (จริงแท้ ศิริพานิช, 2546)

2.5.1 การสูญเสียน้ำ

การสูญเสียน้ำในผลไม้ นอกจากมีผลโดยตรงต่อการสูญเสียน้ำหนักแล้ว ยังทำให้ลักษณะปรากฏภายนอกของผลไม้เหี่ยว ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รวมทั้งคุณภาพภายในผลลดลงอีกด้วย การสูญเสียน้ำในผลิตผลเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของผักและผลไม้ ส่งผลให้อายุการวางจำหน่ายสั้นลง ปกติเนื้อเยื่อพืชมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การลดลงของความชื้นหรือการลดลงของความดันไอน้ำของอากาศ มีผลทำให้เนื้อเยื่อพืชเสื่อมสภาพ (दनัย บุญเกียรติ, 2540; สายชล เกตุษา, 2528) โดยทั่วไปผลไม้จะสูญเสียในรูปของไอน้ำซึ่งมีช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช โดยการแพร่ออกทางช่องเปิดธรรมชาติการสูญเสียน้ำของพืชเกิดจากการคายน้ำ ซึ่งเกิดตลอดเวลา ผลิตผลมีการคายน้ำผ่านช่องทางที่สำคัญ 4 ช่องทาง คือ ปากใบ (stomata) ช่องเปิดตามธรรมชาติ (lenticel) ชั้นเคลือบผิว (cuticular surface) และบาดแผล (wound) การคายน้ำนอกจาก

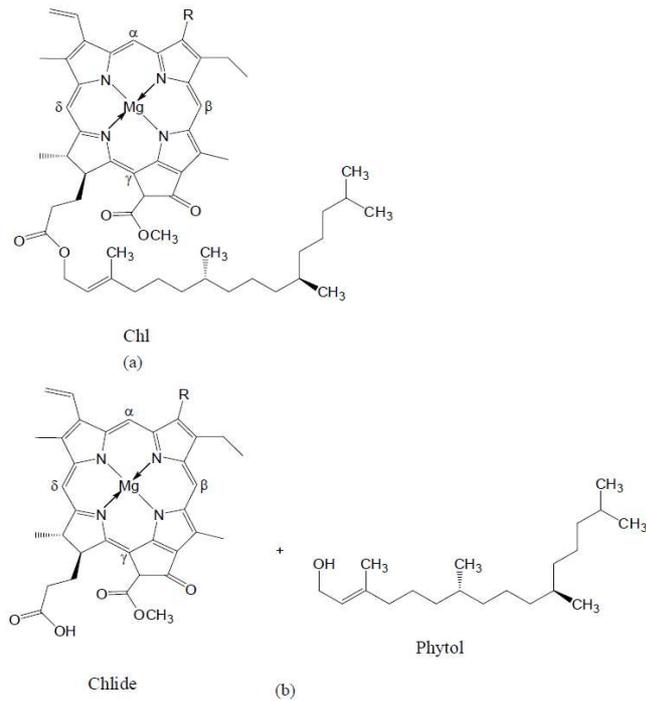
ทำให้น้ำหนักผลผลิตลดลง และยังทำให้รสชาติของผลผลิตด้อยลงด้วย โดยเฉพาะเนื้อสัมผัส (texture) ในพืชตระกูลส้มมักมีการสูญเสียน้ำเร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น เนื่องจากชั้น *albedo* ในเปลือกของผลไม้ชนิดนี้ ประกอบด้วย *spongy cell* โดยในระยะ *mature* เซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์มาก ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น และทำให้ผิวหยาบไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ผลผลิตส่วนใหญ่เมื่อสูญเสียน้ำหนักสดเกินร้อยละ 3 จะหมดสภาพการซื้อขาย เนื่องจากมีเนื้อเยื่อชั้นผิว (*epidermis*) บางและไม้แข็งแรง เนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวประกอบด้วยน้ำมาก เมื่อมีการคายน้ำและการสูญเสียน้ำหนักเพียงเล็กน้อยก็แสดงอาการเหี่ยวปรากฏ (ดิเรก ทองอร่าม และคณะ, 2546; จริงแท้ ศิริพานิช, 2553) ความสดของผลผลิตเป็นดัชนีสำคัญในการเลือกซื้อผักและผลไม้ของผู้บริโภค ดังนั้นภายหลังจากการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปควรมีการเก็บรักษาผลผลิตในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ แต่สภาพที่มีความชื้นสูงก็ทำให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Nguyen-the และ Prunier, 1989)

โดยทั่วไปมะนาวมีการสูญเสียน้ำโดยการแพร่ออกทางช่องเปิดธรรมชาติ ที่เรียกว่า *stomata* (Kaewsuksaeng et al., 2011) ในพืชตระกูลส้มมักมีการสูญเสียน้ำเร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น เนื่องจากชั้น *albedo* ในเปลือกของผลไม้ชนิดนี้ ประกอบด้วย *spongy cell* โดยในระยะ *mature* เซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์มาก ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น การเก็บรักษามะนาวที่อุณหภูมิต่ำสามารถช่วยลดการสูญเสียน้ำได้ (จริงแท้ ศิริพานิช, 2538) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษามะนาวอยู่ในช่วง 10 องศาเซลเซียส (นุกูล เพ็ญพ่ายพ, 2532; อภิญญา เจริญกุล, 2537)

2.5.2 การสลายตัวของคลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบอยู่ในคลอโรพลาสต์ (*chloroplast*) คลอโรฟิลล์มีหลายชนิดได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ บี ซี และดี ซึ่งคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นต่างๆ ของคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดต่างกันด้วย ในพืชชั้นสูงจะพบคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ในอัตราส่วน 3:1 คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ อะซีโตน และอีเธอร์ เป็นต้น (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549) โครงสร้างทางโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ประกอบด้วย ส่วนที่ชอบน้ำ (*hydrophilic*) มีหน้าที่ดูดพลังงานแสง ส่วนนี้มีโครงสร้างเป็นไฟโรลแบบวงแหวน 4 วง (*tetrapyrrol rings*) แต่ละวงมีไนโตรเจนเป็นหลักเกาะล้อมรอบแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้เกิดสี และมีส่วนหาง (*phytyl chain*) ที่เป็นไฮโดรคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาวดังแสดงในรูปที่ 2.3

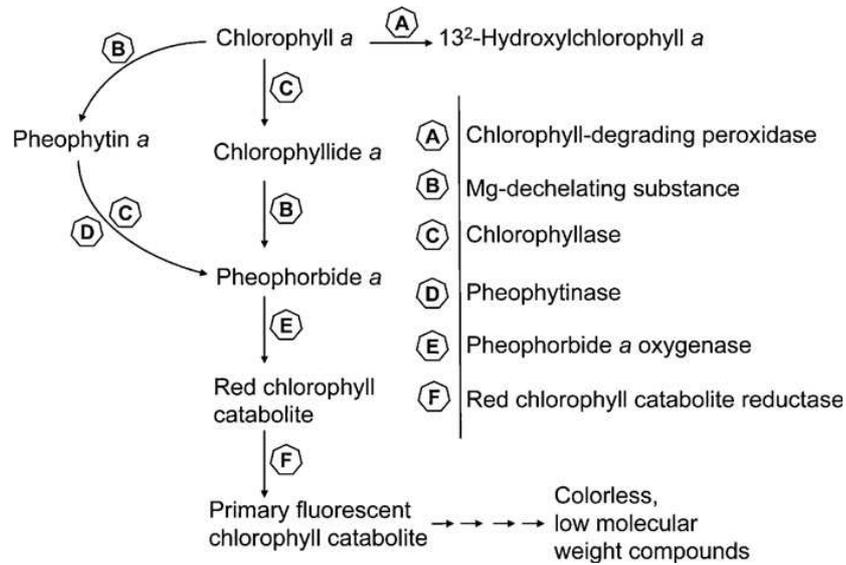


รูปที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของคลอโรฟิลล์

ที่มา: Hörtensteiner and Krüetler (2000)

การเสื่อมสลายของคลอโรฟิลล์และปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในผลิตภัณฑ์สดส่วนใหญ่เกิดขึ้นในคลอโรฟิลล์มากกว่าคลอโรฟิลล์บี โดยถูกกระตุ้นในการย่อยหรือทำลายโครงสร้างโดยเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกลไกได้แก่ *chlorophyll-degrading peroxidase*, *Mg-dechelating substance*, *chlorophyllase*, *pheophytinase*, *pheophorbide a oxygenase* และ *red chlorophyll catabolite reductase* โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีหน้าที่ย่อยและมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันก่อให้เกิดการสะสมอนุพันธ์ของสารสีคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดเกิดขึ้น เช่น *13²-Hydroxychlorophyll a*, *pheophytin a*, *chlorophyllide a*, *pheophorbide a*, *red chlorophyll catabolite* และ *primary fluorescent chlorophyll catabolite* ทำยที่สุดแล้วก็จะเปลี่ยนเป็น เป็นสารไม่มีสีที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2.4 กลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

ที่มา: *Aiamla-or et al. (2012)*

บทบาทของเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

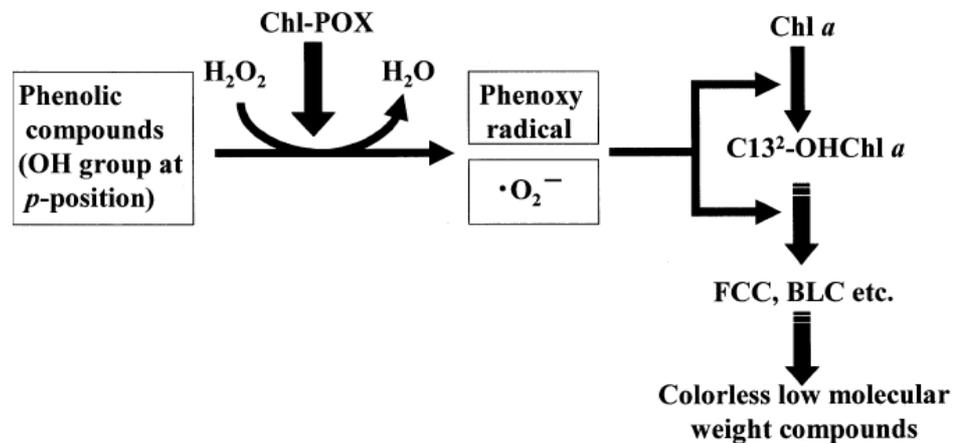
การสลายของคลอโรฟิลล์มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องที่สำคัญ 5 ชนิด คือ

1. *chlorophyllase* เป็น *hydrophobic* ของ *plasmid membrane* (Hirschfeld and Goldschmidt, 1983) ทำให้คลอโรฟิลล์เปลี่ยนไปเป็น *chlorophyllide* และ *phytol* (Yamauchi และ Watada, 1991) โดยการเร่งกระบวนการไฮโดรไลซิส (*hydrolysis*) ของ *Ester linkage* ที่ตำแหน่ง *7-propionic acid* กับหมู่ *phytol* ในโมเลกุลของ *chlorophyll* และ *pheophytin* (Bortlik et al., 1990) แต่การสังเคราะห์เอนไซม์ *chlorophyllase* ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน (Draskiewicz, 1994) นอกจากนี้ Moll et al. (1978) รายงานว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ *chlorophyllase* ในใบของ *Phaseolus vulgaris* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ *plasmid ribosome* หลังจากนั้นจะมารวมกันอยู่ที่ *thylakoid membrane* (Moll and De, 1979) ส่วนในใบ *Chlorella protothecoides* เอนไซม์ *chlorophyllase* จะถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ *cytoplasmid ribosome* (Ganoza and McFeeters, 1976)

2. *Mg-dechelating substance* เป็นสารประกอบที่มีลักษณะการทำงานคล้ายเอนไซม์หรือโปรตีน ทำหน้าที่ย้ายอะตอมของ Mg^{2+} จาก *chlorophyllide* (Langmeier et al., 1993) แล้วแทนที่ด้วย 2H^+ ทำให้ได้อนุพันธ์ *pheophorbide* รายงานส่วนใหญ่พบมากที่เนื้อเยื่อไทลาคอยด์ (Langmeier et al., 1993) โดยคุณสมบัติของ *Mg-dechelating substance* ใน *Chenopodium album* เป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็ก 900 ดาลตัน ค่อนข้างเสถียรต่อความร้อน (Shioi et al., 1996) Costa et al. (2002) รายงานว่ากิจกรรมของ *Mg-dechelation* เกี่ยวข้องกับสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 2,180 ดาลตัน

3. *pheophorbide a oxygenase* เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น คือ *Pheophorbide a* โดยจะไปทำให้เกิดรอยแยกของวงแหวน *porphyrin ring* ของ *pheophorbide* ได้สาร *fluorescent* หรือ *non-fluorescent chlorophyll catabolite* (Matile et al., 1996)

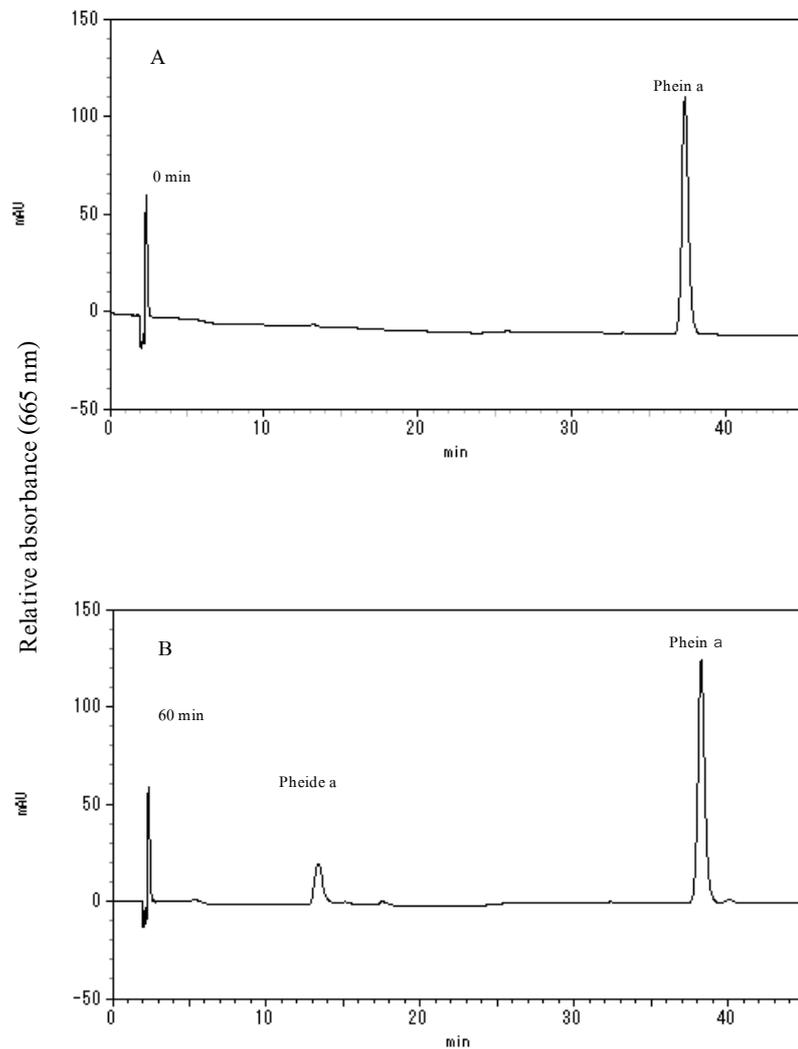
4. *chlorophyll-degrading peroxidase (chl-POX)* เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคลอโรฟิลล์ โดยเข้าไปทำลายพันธะคู่วงแหวน *porphyrin* ให้เปลี่ยนไปเป็นสารที่ไม่มีสี (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ที่เกิดจากกระบวนการ Oxidation

ที่มา: Yamauchi et al. (2004)

5. *pheophytinase* เป็นเอนไซม์ที่พบในคลอโรพลาสต์ของ *Arabidopsis* (Schelbert et al., 2009) โดยยีน *pheophytin pheophorbide hydrolase, PPH* ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายในกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์คือ *pheophytinase* โดยไปย่อยอนุพันธ์ *pheophytin* ซึ่งเป็นอนุพันธ์สารตั้งต้นเดียวกันของเอนไซม์ *chlorophyllase* แล้วเกิดการสร้างอนุพันธ์ *pheophorbide* Kaewsuksaeng et al. (2011) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* ในมะนาวพันธุ์ตาดิธิ (*Citrus latifolia* Tan.) หลังการเก็บเกี่ยว โดยทำการหาวิธีการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* มีกิจกรรมที่สูงในขณะที่ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี ลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาสอดคล้องกับการเหลืองของมะนาว โดยมีการสะสมของอนุพันธ์ *pheophorbide* เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น (รูปที่ 2.6) เช่นเดียวกันในบร็อกโคลี่หลังการเก็บเกี่ยวจะมีกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* สูง เมื่อสีเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง (Aiamla-or et al., 2012)



รูปที่ 2.6 การเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์ *pheophorbide a* หลังจากการปฏิบัติของเอนไซม์ *pheophytinase* ในมะนาว

ที่มา: Kaewsuksaeng (2011)

2.5.3 การสูญเสียวิตามินซี (Vitamin C)

ผักและผลไม้เป็นแหล่งวิตามินที่สำคัญ โดยเฉพาะวิตามินเอและซี ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารที่ถูกรีดิวส์อย่างรุนแรง ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายแม้โดยออกซิเจนในอากาศ วิตามินซีทำหน้าที่เป็น *antioxidant* ให้แก่ร่างกายเพื่อไปคอยทำลาย *free radical* ที่เกิดจากออกซิเจนที่เป็นอันตรายต่อผนังเซลล์ ในปัจจุบันพบว่าวิตามินซีมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ *immune* ในร่างกายได้ เช่น ไปกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง *interferon* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไปต่อต้านเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ นอกจากนี้วิตามินซียังช่วยกระตุ้นให้ร่างกายทำการสังเคราะห์ *antibodies IgG* และ *IgM* เพื่อมาทำหน้าที่ป้องกัน

การติดเชื้อในร่างกายอีกด้วย และยังพบว่า การรับประทานวิตามินซีวันละ 10 มิลลิกรัม สามารถลดอาการแพ้ได้เป็นอย่างดี วิตามินเอ และวิตามินซีในผลไม้ก่อนล้างเสถียร วิตามินซีส่วนใหญ่อยู่ในรูป *reduce ascorbic acid* (90 เปอร์เซ็นต์) ผักและผลไม้ที่เก็บเกี่ยวมาใหม่และมีการจัดการที่ดี จะมีปริมาณวิตามินซีอยู่สูง ส่วนผักผลไม้ที่ขาดการจัดการที่ดีหลังการเก็บเกี่ยวปริมาณวิตามินซีจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Horemans et al., 2000) การสูญเสียวิตามินซีเกิดขึ้นได้ง่ายเมื่อผลิตผลเกิดบาดแผล เช่น การหั่น การตัด หรือการชำ เป็นต้น ซึ่งรวมทั้งสภาพแวดล้อมในระหว่างการเก็บรักษาก็มีบทบาทที่สำคัญต่อการสูญเสียวิตามินซีของผลผลิต (จริงแท้ ศิริพานิช, 2538)

2.6 การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะนาว

การเก็บรักษาผลมะนาว จะขึ้นอยู่กับกระบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ตลอดจนสภาพแวดล้อมภายหลังการเก็บเกี่ยวเป็นสำคัญ วิธีการต่างๆ ที่นำมาใช้เก็บรักษามีหลายวิธี ซึ่งมีวิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.6.1 การใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นการป้องกันกำจัดโรคโดยวิธีทางกายภาพหรือทางฟิสิกส์ เป็นการใช้อุณหภูมิสูงเพื่อระงับหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของโรคบริเวณผิวและภายในเนื้อเยื่อพืช โดยความร้อนนั้นสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์อ่อนแอหรือตายได้ แต่ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช ความร้อนที่ใช้ก็มีทั้ง ความร้อนแห้ง (*hot air*) และความร้อนชื้น (*humidified hot air*) หรือแช่ในน้ำร้อน (*hot water*) (ประเทือง สง่างศ์, 2533) การใช้ความร้อนที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เป็นอันตรายกับผลไม้สามารถกำจัดหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ได้ การใช้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์ในแง่ต้นทุนต่ำ ใช้เครื่องมือง่ายๆ และไม่มีสารเคมีตกค้างบนผิวของผลไม้ (จริงแท้ ศิริพานิช, 2537)

2.6.2 การใช้สารเคลือบผิว

การขัดและการเช็ดหรือการล้างน้ำเพื่อทำความสะอาด จะทำให้ประชากรจุลินทรีย์ที่มีในผิวและผลไม้บางชนิดหลุดหายไปบางส่วน ซึ่งมีผลทำให้ผลผลิตมีการสูญเสียน้ำมากขึ้น และยังอ่อนแอต่อการเข้าทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์ การเคลือบผิวให้ผลผลิตใหม่ด้วยไขก็จะช่วยลดการสูญเสียน้ำออกทางผิว ลดการหายใจ ช่วยป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ต่างๆ และยังช่วยปรับปรุงลักษณะปรากฏให้เห็นจากภายนอกของผลผลิตให้มีความสวยงามดึงดูดผู้บริโภคด้วย (กนกมณฑล ศรศรีวิชัย, 2526)

2.6.3 การบรรจุในถุงพลาสติก

การยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ โดยการเก็บในถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นทำให้เก็บรักษาผลไม้ได้นานขึ้น (พีรเดช ทองอำไพ, 2537) การบรรจุในถุงพลาสติก จะช่วยลดอัตราการคายน้ำ

ของผลและลดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างภายในและภายนอกผล จึงทำให้ลดอัตราการหายใจและการสังเคราะห์เอทิลีนได้ แต่ในการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิที่ปิดสนิทควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำที่เหมาะสม มิฉะนั้นจะเกิดการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน ผลจะเน่าและมีกลิ่นหืนได้ (นิภา คุณทรงเกียรติ และคณะ, 2541)

2.6.4 การใช้อุณหภูมิต่ำ

ผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวแล้วยังคงมีชีวิตอยู่ ทำให้มีกระบวนการต่างๆ เกิดขึ้น เช่นเดียวกับที่ดำเนินการอยู่ภายในเนื้อเยื่อของผลผลิตขณะยังติดบนต้น โดยที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับชนิดของผลผลิตและสภาพแวดล้อม ซึ่งอุณหภูมินับว่าเป็นปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่สำคัญในการเก็บรักษาผักและผลไม้ให้มีคุณภาพคงเดิม การเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลอการเน่าเสียของผลผลิตได้ โดยจะทำให้ขบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น อัตราการหายใจและการสังเคราะห์เอทิลีนเกิดช้าลง ตลอดจนช่วยชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่ระบาดของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะเข้าทำลายผลผลิตได้ (दनัย บุญเกียรติ และนิธิยา รัตนปนนท์, 2531)

2.6.5 การใช้สารเคมี ปัจจุบันได้มีการแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ คือ

2.6.5.1 สารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน ได้แก่ *aminoethoxyvinylglycine (AVG)* และ *aminooxy acetic acid (AOA)* การพ่น AVG ก่อนการเก็บเกี่ยวแอปเปิลสามารถชะลอการสุกได้ (Bramlage et. al., 1980) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งกระบวนการสุกของสาลี่ (Romani et.al., 1982)

2.6.5.2. สารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีน การใช้สารเคมีในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนมีคุณสมบัติที่ดีกว่าสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน เนื่องจากพืชมีการตอบสนองต่อเอทิลีนได้ทั้งจากแหล่งภายในและภายนอก (Abeles et.al., 1992) ดังนั้นการควบคุมเอทิลีนในขั้นตอนการสังเคราะห์จึงมีข้อจำกัดเนื่องจากผลผลิตอาจได้รับเอทิลีนจากแหล่งภายนอก (Feng et.al., 2000) ด้วยเหตุนี้การใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอทิลีนจึงมีความเหมาะสมหรือมีคุณสมบัติที่ดีกว่าเมื่อนำมาใช้กับผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากตัวยับยั้งดังกล่าวจะสามารถป้องกันและต่อต้าน เอทิลีนได้ Serek et.al. (1994) รายงานว่าสารประกอบที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนมีหลายชนิดได้แก่

- *silver thiosulphate (STS)* จัดเป็นตัวยับยั้งที่มีประสิทธิภาพ แต่ข้อจำกัดของการใช้ *silver* คือ ทำให้เกิดของเสียที่กำจัดยากและสามารถสร้างมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อมได้

- สารประกอบ *2,5- nonbornadiene* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนได้ดี แต่ข้อเสียคือมีกลิ่นฉุนรุนแรง มีคุณสมบัติในการกัดกร่อน จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับผลผลิตทางการเกษตรมากนัก

- *diaro derivative (DACP)* สามารถจับกับตัวรับเอทิลีนได้ แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนต่ำ และมีข้อจำกัดคือเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงอาจเกิดการระเบิดได้

การใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอทิลีนดังกล่าวอาจไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ ด้วยเหตุผลหรือข้อจำกัดหลายประการ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะหาสารใหม่ทดแทน ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบสารประกอบ *1-methylcyclopropene (1-MCP)* เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอทิลีน โดยสามารถจับกับตัวรับเอทิลีน ทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนได้ นอกจากนั้นสารดังกล่าวยังมีคุณสมบัติที่ดีในการนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากเป็นสารประกอบที่ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นพิษ และมีประสิทธิภาพสูง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (*Kende et.al., 1982; Serek et.al., 1994*)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเตรียมผลผลิต

ในการทดลองครั้งนี้ใช้มะนาวพันธุ์แป้นขนส่งมาจากจังหวัดเพชรบุรี และพันธุ์ตาดิชนส่งมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พื้นที่การศึกษาบางขุนเทียน กรุงเทพฯ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกผลมะนาวที่มีขนาดผลใกล้เคียงกัน มีสีเขียวสม่ำเสมอเกือบทั้งผล ไม่มีรอยตำหนิจากโรค หลังจากนั้นนำมาทำความสะอาด ตัดแต่งขั้วผลให้เรียบร้อย จากนั้นนำเข้าชุดการทดลอง

3.2 การวางแผนการทดลอง

3.2.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาดิ

นำมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาดิ ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมผลผลิต จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ผลจนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (*Completely Randomized design*) แต่ละการทดลองมี 5 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทุกๆ 3 วัน โดยมีชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 : มะนาวพันธุ์แป้น

ชุดการทดลองที่ 2 : มะนาวพันธุ์ตาดิ

การบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. การสูญเสียน้ำหนัก
2. สีเปลือก (L^* และ Hue angle)
3. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (*total soluble solid, TSS*)
4. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (*titratable acidity, TA*)
5. ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ
6. ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด
7. ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด (*Roe et al., 1948*)
8. กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase*

3.2.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ที่สกัดได้จากเปลือกมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาอิตี

ทำการเก็บตัวอย่างเปลือกมะนาวในรูป *acetone powder* โดยเก็บตัวอย่างเปลือกมะนาวพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาจากการทดลองที่ 1 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* และนำไปใช้สกัดโปรตีนในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ *ammonium sulfate* ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ที่ความเข้มข้นตั้ง 0-100 เปอร์เซ็นต์

นำเอนไซม์ปฏิกิริยาจากการทดลองข้างต้นวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ดังนี้ (Kaewsuksaeng et al., 2010)

1. pH ที่เหมาะสม (the pH optimum)
2. อุณหภูมิที่เสถียร (the temperature stability)

3.3 บันทึกผลการทดลอง

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด

การวัดการสูญเสียน้ำหนักสด ทำโดยชั่งน้ำหนักสดในแต่ละชุดการทดลอง ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาแล้วคิดเป็นร้อยละของการสูญเสียน้ำหนัก โดยคำนวณการสูญเสียน้ำหนักจากสมการ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก

ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกมะนาวด้วยเครื่องวัดสี *Minolta Chroma Meter (Model CR-100, Tokyo, Japan)* โดยให้ผลสัมพันธ์กับหัววัดมากที่สุด ทำการวัดสี 2 ครั้ง ต่อ ผล โดยวัดบริเวณกลางผล ทั้ง 2 ด้าน และใช้ระบบการวัดสีแบบ *Three-dimension color space* ซึ่งรายงานผลเป็นค่า *Hunter Scale* (McGuire, 1992; Voss, 1992) ประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

- L^* เป็นค่าความสว่างของสี ซึ่งค่า L^* มีค่า 0 ถึง 100

ถ้าค่า L^* สูง หมายถึง มีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L^* ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมาก

- a^* เป็นค่าการแสดงผลออกของสีในช่วงสีเขียวไปจนถึงสีแดง

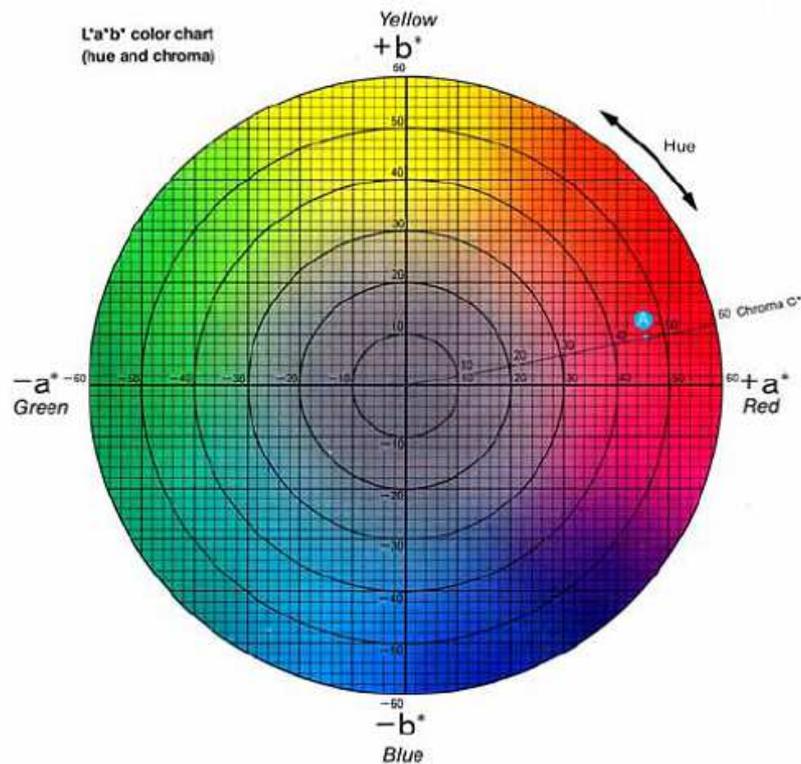
เมื่อค่า a^* เป็นลบจะอยู่ในช่วงสีเขียว ถ้าค่า a^* เป็นบวกจะอยู่ในช่วงสีแดง

- b^* เป็นค่าการแสดงผลออกของสีในช่วงสีน้ำเงินไปจนถึงสีเหลือง

เมื่อค่า b^* เป็นลบจะอยู่ในช่วงสีน้ำเงิน ถ้าค่า b^* เป็นบวกจะอยู่ในช่วงสีเหลือง

- Hue หรือ Hue angle สามารถคำนวณได้จากมุมระหว่างด้านตรงข้ามกับมุมฉาก และ 0° บนแกนของ a (เขียวน้ำเงิน/ม่วงแดง) และ $^\circ$ Hue จะเป็นค่ามุมอยู่ในระหว่าง $0^\circ - 360^\circ$ ของวงสี ดังแสดงในรูปที่ 3.1

การอ่านผล คือ ถ้าค่าที่ได้อยู่ใกล้ 90° แสดงให้เห็นว่าสีเปลือกมะนาวเกิดการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหมด แต่ถ้าค่าที่ได้อยู่ใกล้ 180° แสดงให้เห็นว่าสีเปลือกมะนาวยังเป็นสีเขียว



รูปที่ 3.1 color chart

3.3.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Moran, 1982)

ชั่งตัวอย่างเปลือกมะนาวปริมาณ 0.25 กรัม แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก จากนั้นเติม $N-N$, *Dimethylformamide* ปริมาตร 5 ml นำไปตั้งทิ้งไว้ที่มีดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง *Whatman* เบอร์ 2 แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง *spectrophotometer* (*Shimadzu*, Japan) ที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์จากสมการ

$$C_a (\mu\text{l} / \text{mg of plant extract}) = (12.7A_{663} - 2.69A_{645}) * wl$$

$$C_b (\mu\text{l} / \text{mg of plant extract}) = (22.9A_{645} - 4.68A_{663}) * wl$$

$$C_{a+b}(\mu\text{l}/\text{mg of plant extract}) = (20.2A_{645} + 8.02A_{663}) * w\text{l}$$

กำหนดให้

A หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากความยาวช่วงคลื่น (nm)

C_a หมายถึง Chlorophyll a

C_b หมายถึง Chlorophyll b

C_{a+b} หมายถึง Total chlorophyll

wl หมายถึง การสูญเสียน้ำหนักสด (%)

3.3.4 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

นำน้ำมะนาวมาวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้หรือ total soluble solids โดยใช้ Hand refractometer โดยใช้ Hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น NI ค่าที่ได้อ่านได้เป็นองศาบริกซ์ (°Brix)

3.3.5 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Association of Official Analytical Chemistry, 1990)

นำน้ำมะนาวปริมาณ 5 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้ phenolphthaline ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1-2 หยด เป็น indicator จนถึงจุดยุติ (เมื่อสารละลายมีสีชมพูอ่อนอย่างน้อย 30 วินาที) แล้วคำนวณปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ TA} = \frac{(\text{ml NaOH}) (N \text{ NaOH}) (\text{meq.wt.citric acid}) \times 100}{\text{Wt of sample}}$$

$$\text{meq.wt.citric acid} = 0.064$$

3.3.6 ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด (Roe et al., 1948)

นำตัวอย่างน้ำมะนาว 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Metaphosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ทำในที่เย็น) ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง Homogenizer หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนที่กรองได้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีทั้งหมด โดยนำสารละลายที่ได้อีก 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Indophenol ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ นาน 2-3 นาที จากนั้นให้สังเกตสีของสารละลาย หากสีของสารละลายเสถียรเป็นสีชมพูแล้วจึงเติมสารละลายต่อไป (หากสีของสารละลายไม่เปลี่ยนหรือไม่ปรากฏสีชมพู ให้ทำการเจือจางสารละลายด้วยสารละลาย metaphosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 จนตัวอย่างมีสีชมพู) จากนั้นเติมสารละลาย thiourea ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และ 2,4 – dinitrophenyl hydrazine (DNP) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Sulfuric acid ความเข้มข้นร้อยละ 85 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำในที่เย็น) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณ ascorbic acid

ทั้งหมด โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ *ascorbic acid* ความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.7 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

3.3.7.1 การเตรียม *Chlorophyll a acetone solution* (ตัดแปลงจาก Costa et al., 2005)

นำไปปวยหลังหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนักมา 15 กรัม เติม *acetone* ปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียดด้วย *homogenizer* เป็นเวลา 3 นาที กรองตัวอย่างด้วยผ้า *miracloth* หลังจากนั้น เติม *dioxane* ปริมาตร 10.5 ml และเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บตะกอนไว้ แล้วเติม *acetone* ปริมาตร 40 มิลลิลิตร *dioxane* ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 14 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนละลาย ทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้แล้วเติม *petroleum ether* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ตะกอนละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ซึ่งเรียกว่า *crude chlorophyll* ไปแยกเอาเฉพาะ *chlorophyll a* โดยใช้ *sugar chromatography column* โดยวิธีการบรรจุ *column* มีดังนี้ ใส่สำลีเข้าไปใน *column* แล้วผสมน้ำตาลกับ *petroleum ether* (ใส่น้ำตาลในบีกเกอร์แล้วค่อยๆเติม *petroleum ether* ตามลงไป) ใส่ลงใน *column* ใช้แท่งแก้วอัดให้น้ำตาลใน *column* แน่น และพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ เพื่อเวลาแยก *chlorophyll* จะได้แถบของ *chlorophyll a* แยกออกมาได้เท่าๆกัน หลังจากใส่น้ำตาลลงใน *column* เสร็จ แล้วจึงเติม Na_2SO_4 ลงไปใน *column* แล้ววางกระดาษกรอง *Whatman เบอร์ 1* ลงไป เติม *crude chlorophyll* ลงไปโดยใช้ *petroleum ether* เป็นตัวชะให้ *carotenoid* เคลื่อนที่ลงมา หลังจาก *carotenoid* ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง ไหลลงมาได้ประมาณครึ่งหนึ่งของ *column* ให้เปลี่ยนสารละลายที่ใช้เป็น *petroleum ether : Isopropanol (99.5 : 0.5 v/v)* สังเกตสารละลายในบีกเกอร์ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนน้ำเงิน ให้เปลี่ยนมาใช้บีกเกอร์ที่หุ้มด้วยฟอยด์มารองรับแทน นำ *chlorophyll a* ที่แยกได้ปริมาตร 30 ml มาระเหยเอาสารละลาย *petroleum ether : isopropanol* ออกด้วยเครื่อง *evaporator* โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม *acetone* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดหาความเข้มข้นของ *chlorophyll a* ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 661.6 และ 644.8 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง *spectrophotometer (Shimadzu, Japan)* นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ *chlorophyll a* จากสมการ

$$\text{Chlorophyll } a \text{ concentration } (\mu\text{l} / \text{mg of plant extract}) = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$$

กำหนดให้

A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากความยาวคลื่น (nm)

3.3.7.2 การเตรียม *acetone powder* เพื่อใช้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ (Arkus et al., 2005)

นำเปลือกมะนาว 5 กรัม เติม *acetone* ที่เย็นจัด ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไป แล้วนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง *homogenizer* จากนั้น กรองด้วยกระดาษกรอง *Whatman เบอร์ 1* โดยใช้ปั๊มอากาศ นำตะกอนที่ได้ล้างด้วย *acetone* และนำไปปั่นอีกจนกระทั่งตะกอนไม่มีสี (เป็นสีขาว) จึงเติม *diethyl ether* ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งนาน 3 ชั่วโมงใน *desiccator* เก็บ *Acetone powder* ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์

3.3.7.3 การเตรียม *pheophytin a* เพื่อใช้เป็น *substrate* ในกิจกรรมของเอนไซม์ *pheophytinase* (ดัดแปลงจาก Schelbert et al., 2009)

นำ *Chlorophyll a* ปริมาตร 3 ml เติม *HCl* ที่ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 2 หยด หลังจากนั้น เติม *NaOH* ที่ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 2 หยด

3.3.7.4 การสกัด *crude enzyme* สำหรับกิจกรรมของ *chlorophyllase* (Suzuki and Shioi, 2002)

นำ *acetone powder* 0.5 กรัม เติมสารละลาย *phosphate buffer pH 7* (50 mM *KCl* และ 0.12% *TritonX-100*) ที่ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 15 ml คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองด้วย *miracloth* จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 16000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3.7.5 การสกัด *crude enzyme* สำหรับกิจกรรมของ *pheophytinase* (Schelbert et al., 2009)

นำ *acetone powder* 0.5 กรัม เติมสารละลาย *Tris-HCl pH 8* ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองด้วย *miracloth* จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.3.7.6 กิจกรรมของเอนไซม์ *Chlorophyllase* (Amir-Shapira et al., 1987)

นำ *crude enzyme* ที่สกัดได้ (จาก 3.2.7.4) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ *Triton-X100* ที่ความเข้มข้น 1.44 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม *chlorophyll a acetone solution* (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ *acetone*) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ *phosphate buffer* (pH 7.5) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม *acetone* ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และแยกส่วนของ *chlorophyllide a* ออกจาก *chlorophyll a* โดยเติม *hexane* ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนของสารละลายชั้นล่าง มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง *spectrophotometer* (Shimadzu, Japan) จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โดยเทียบกับค่า *Coefficient* ของ *chlorophyllide a* = $76.79 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ โดยมีหน่วยของเอนไซม์คือ $\text{Unit}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{protein}$

3.3.7.7 กิจกรรมของเอนไซม์ *pheophytinase* (ดัดแปลงจาก *Schelbert et al., 2009*)

นำ *crude enzyme* ที่สกัดได้ (จาก 3.2.7.5) ปริมาตร 0.5 ml มาทำปฏิกิริยากับ *Tris-HCl pH 8* ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ *pheophytin a* ปริมาตร 0.2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม *acetone* ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และแยกส่วนของ *pheophocide a* ออกจากชั้นของ *pheophytin a* โดยเติม *hexane* ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำส่วนของสารละลายชั้นล่างมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเทียบกับค่า *Coefficient* ของ *pheophocide a* = $7.08 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ โดยมีหน่วยของเอนไซม์คือ $\text{Unit}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$

3.3.7.8 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* (*Kaewsuksaeng et al., 2010*)

นำ *acetone powder* 1.5 กรัม เติมสารละลาย *phosphate buffer pH 7* (50 มิลลิโมลาร์ *KCl* และ 0.12 เปอร์เซ็นต์ *tritonX-100*) ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองด้วย *mila cloth* จากนั้นนำไป *centrifuge* ที่ความเร็ว $10,000\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำ *crude enzyme* ที่สกัดได้มาเติม *Ammonium sulfate* (0-20 เปอร์เซ็นต์ ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (ดังภาคผนวก ข.) คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (หรือจนกว่าสารละลาย) จากนั้นนำไป *centrifuge* ที่ความเร็ว $10,000\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำ *crude enzyme* ที่สกัดได้ได้มาเติม *ammonium sulfate* (20-40, 40-60, 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (ภาคผนวก ข.) คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (หรือจนกว่าสารละลาย) จากนั้นนำไป *centrifuge* ที่ความเร็ว $10,000\times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำ ตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาเติม *phosphate buffer pH 7.5* ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* (จาก 3.2.7.6) และ *pheophytinase* (จาก 3.2.7.7)

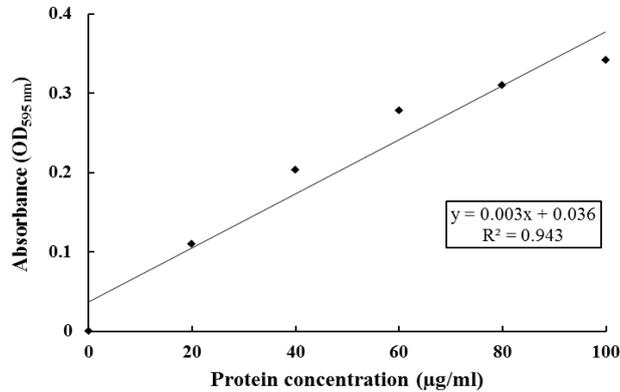
3.3.7.9 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ *Bradford*

การเตรียมสารละลาย *Coomassie brilliant blue* โดยนำสาร *Coomassie blue 100* มิลลิกรัม มาละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 50 มิลลิลิตร จนกระทั่งละลายหมด แล้วเติมสาร *phosphoric acid* ความเข้มข้นร้อยละ 85 จำนวน 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง *Whatman เบอร์ 2*

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ดูดสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย *Coomassie blue* 4 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

จากนั้นนำค่าที่อ่านได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin) และรายงานผลในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.2 กราฟโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน

ชั่งโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma Co.,Ltd.) จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายใน phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายโปรตีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาเจือจางด้วย phosphate buffer pH 7.0 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆและนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.2) กำหนดให้ A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากความยาวคลื่น (นาโนเมตร)

3.4 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
2. ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

บทที่ 4

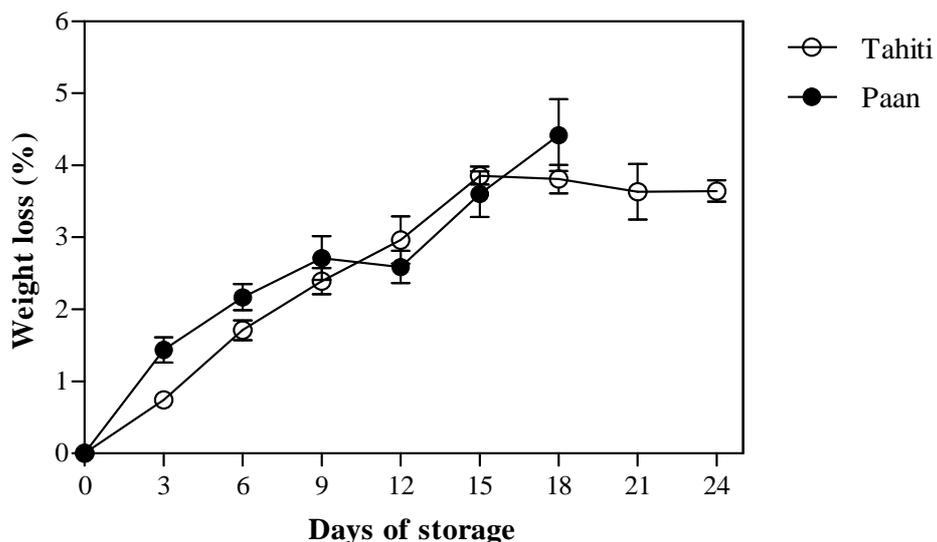
ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพหลังการเก็บเกี่ยวของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบการเปลี่ยนแปลงในด้านต่างๆ ดังนี้

4.1.1 การสูญเสียน้ำหนัก

การสูญเสียน้ำหนักของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์แป้น และสายพันธุ์ตาฮิติ พบว่าการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (รูปที่ 4.1) โดยพบว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติมีการสูญเสียน้ำหนักน้อยกว่ามะนาวพันธุ์แป้น จึงทำให้มะนาวพันธุ์ตาฮิติมีอายุการเก็บรักษานานกว่ามะนาวพันธุ์แป้น ซึ่งมะนาวพันธุ์แป้นมีอายุการเก็บรักษานาน 18 วัน (การสูญเสียน้ำหนักเท่ากับ 4.42 เปอร์เซ็นต์) และในส่วนของมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีอายุการเก็บรักษานาน 24 วัน (การสูญเสียน้ำหนักเท่ากับ 3.64 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตามการสูญเสียน้ำหนักของมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก.1)

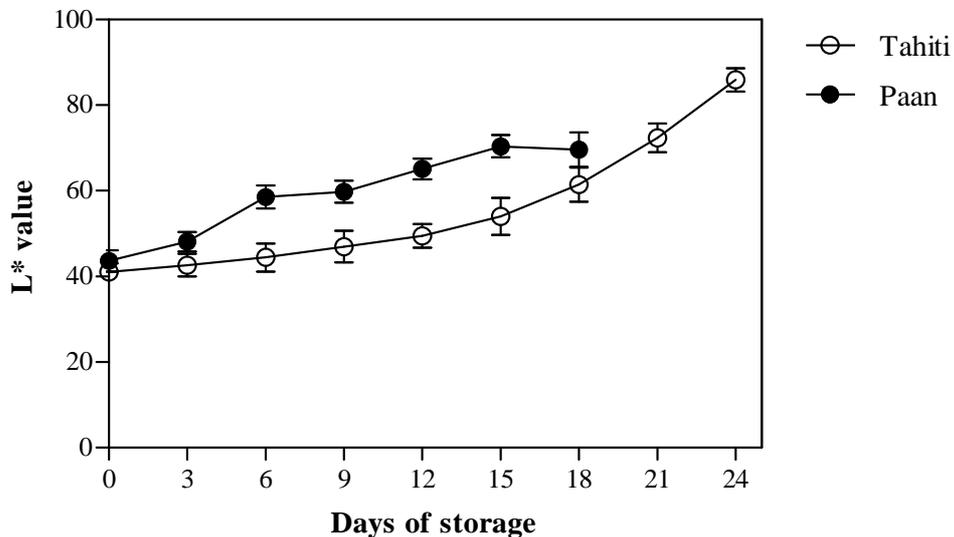


รูปที่ 4.1 การสูญเสียน้ำหนักของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.2 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของมะนาว

ค่าความสว่าง (L^* value)

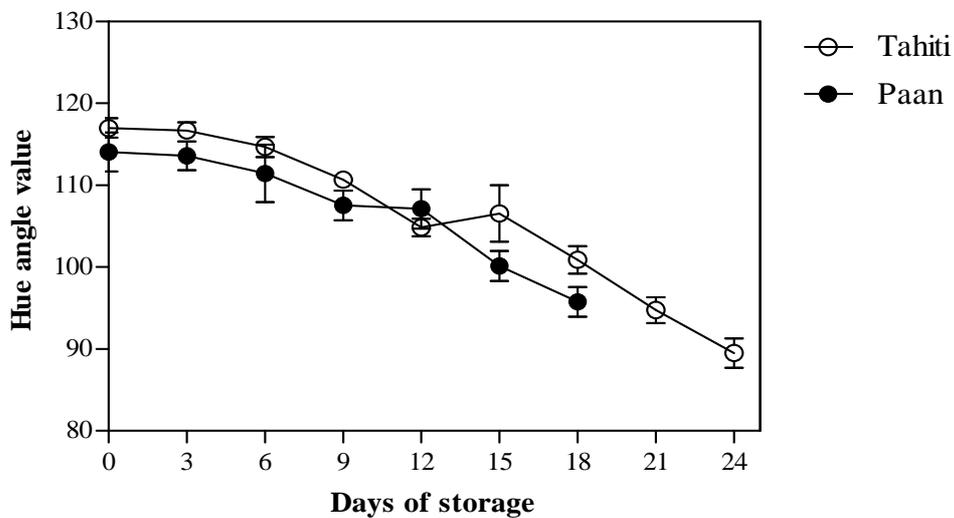
ค่าความสว่างของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษา โดยพบว่าค่าความสว่างของมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ ในวันเริ่มต้นของการเก็บรักษามีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเก็บรักษานานขึ้นมะนาวพันธุ์แป้นมีค่าความสว่างเพิ่มขึ้นมากกว่าพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งแสดงว่าสีเปลือกของมะนาวพันธุ์แป้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีเหลืองเร็วกว่าพันธุ์ตาฮิติ ดังนั้นจึงทำให้มีอายุการเก็บรักษาเพียง 18 วัน ในขณะที่มะนาวพันธุ์ตาฮิติมีการเปลี่ยนแปลงสีช้ากว่าและมีอายุการเก็บรักษา 24 วัน เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างระหว่างมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาคผนวก ก.2) (รูปที่ 4.2)



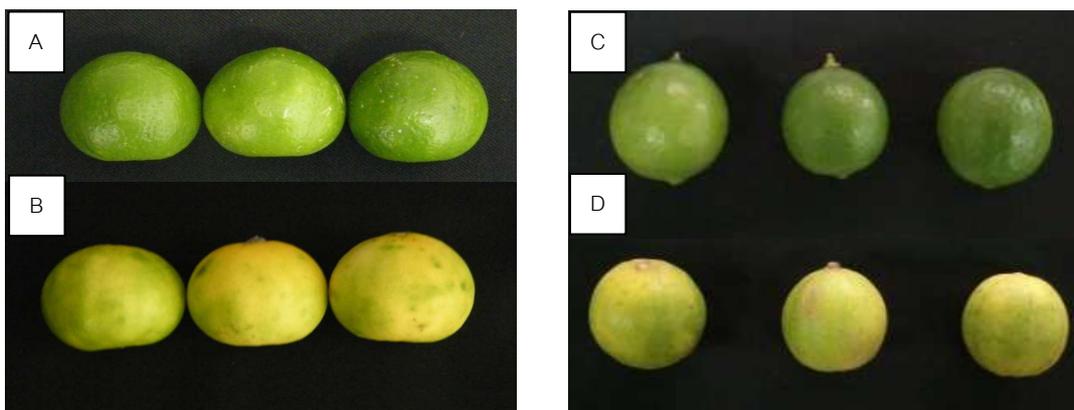
รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง L^* value ของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ค่า Hue angle

การเปลี่ยนแปลงค่า Hue angle ของเปลือกมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาทิ จากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า Hue angle ของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาทิ มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงอายุการเก็บรักษา โดยพันธุ์ตาทิค่า Hue angle เท่ากับ 89.52 ในวันที่ 24 ของการเก็บรักษาซึ่งมีค่าน้อยกว่ามะนาวพันธุ์แป้น ที่มีค่า Hue angle เท่ากับ 95.76 ในวันที่ 18 ของอายุการเก็บรักษา (รูปที่ 4.3) การลดลงของค่า Hue angle สูงแสดงให้เห็นว่าสีเปลือกมะนาวมีการพัฒนาสีจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองมากขึ้น (รูปที่ 4.4) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก.3)



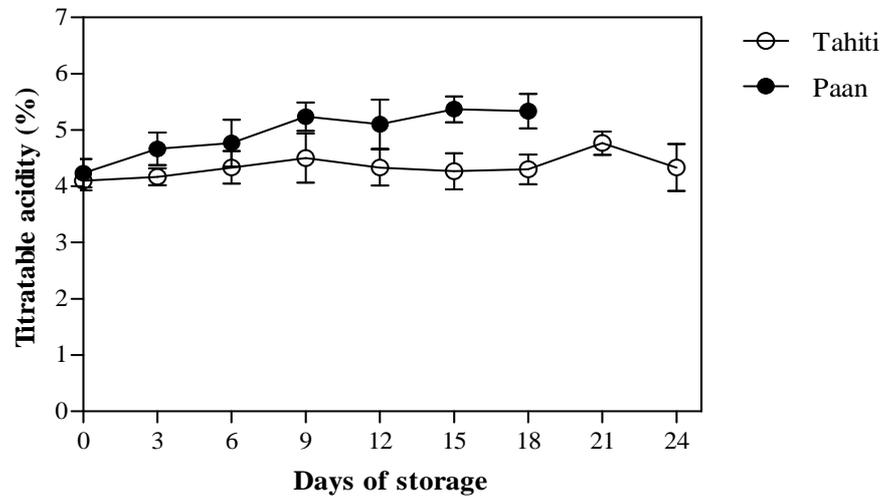
รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่า Hue angle ของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาทิ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาทิ A. วันเริ่มต้นของการเก็บรักษามะนาวพันธุ์แป้น (วันที่ 0), B. วันสุดท้ายของการเก็บรักษามะนาวพันธุ์แป้น (วันที่ 18), C. วันเริ่มต้นของการเก็บรักษามะนาวพันธุ์ตาทิ (วันที่ 0), D. วันสุดท้ายของการเก็บรักษามะนาวพันธุ์ตาทิ (วันที่ 24)

4.1.3 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity)

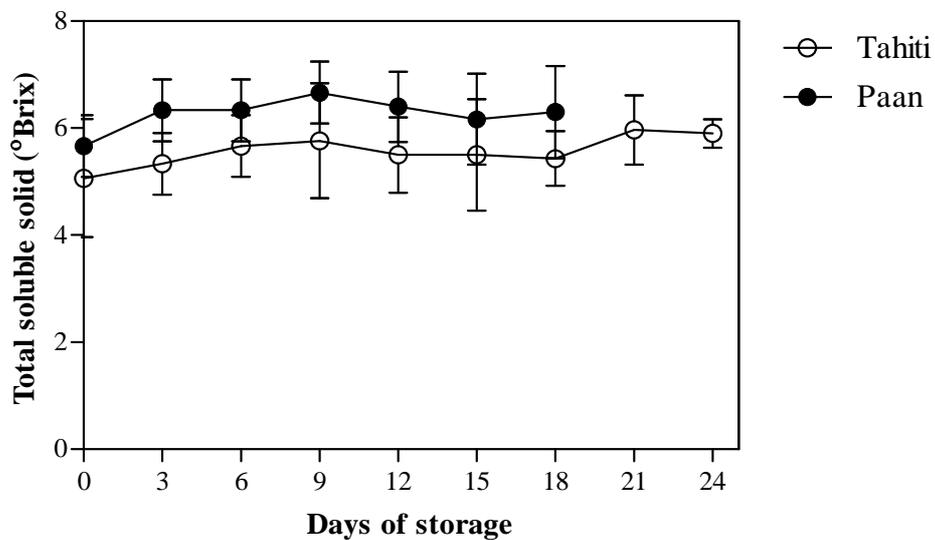
ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้จากน้ำคั้นเนื้อของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีติ มีค่าเริ่มต้นใกล้เคียงกันคือ 4.23 และ 4.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของมะนาวพันธุ์แป้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และมีค่าเท่ากับ 5.33 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 18 ของการเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณกรดที่ไทเทรตในน้ำคั้นของมะนาวพันธุ์ตาฮีติมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วง 18 วันของการเก็บรักษา หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยในวันที่ 24 ของการเก็บรักษามีปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เท่ากับ 4.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่า ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในมะนาวพันธุ์แป้นมากกว่าพันธุ์ตาฮีติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.5) (ภาคผนวกที่ ก.4)



รูปที่ 4.5 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตจากน้ำคั้นเนื้อของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮีติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.4 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solids)

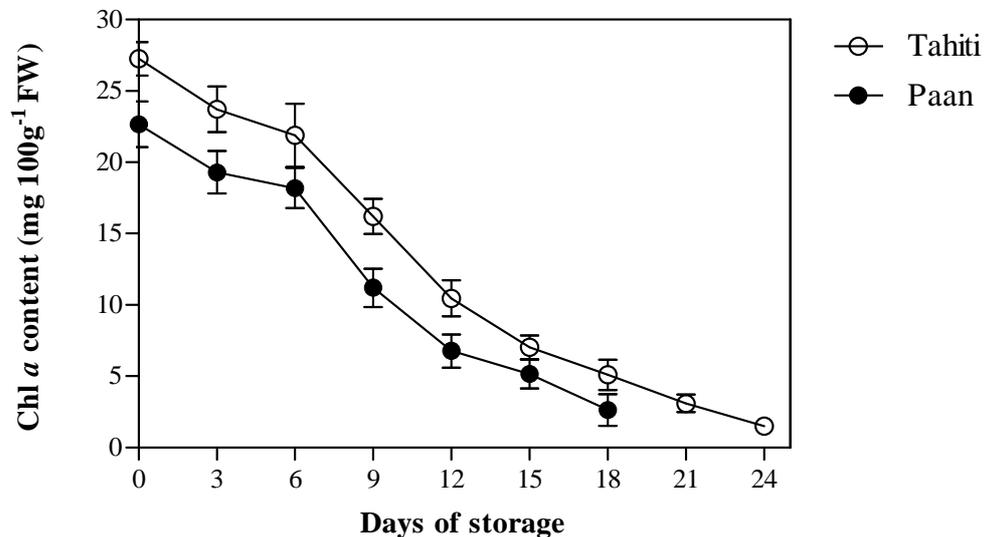
ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้จากน้ำคั้นของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในน้ำคั้นของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ มีค่าคงที่ตลอดอายุเก็บรักษา (รูปที่ 4.6) โดยพบว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้สูงกว่า มะนาวพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.30°Brix (ในวันที่ 18 ของการเก็บรักษา) และมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 5.90 (ในวันที่ 24 ของการเก็บรักษา) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก.5)



รูปที่ 4.6 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้จากน้ำคั้นเนื้อของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.5 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

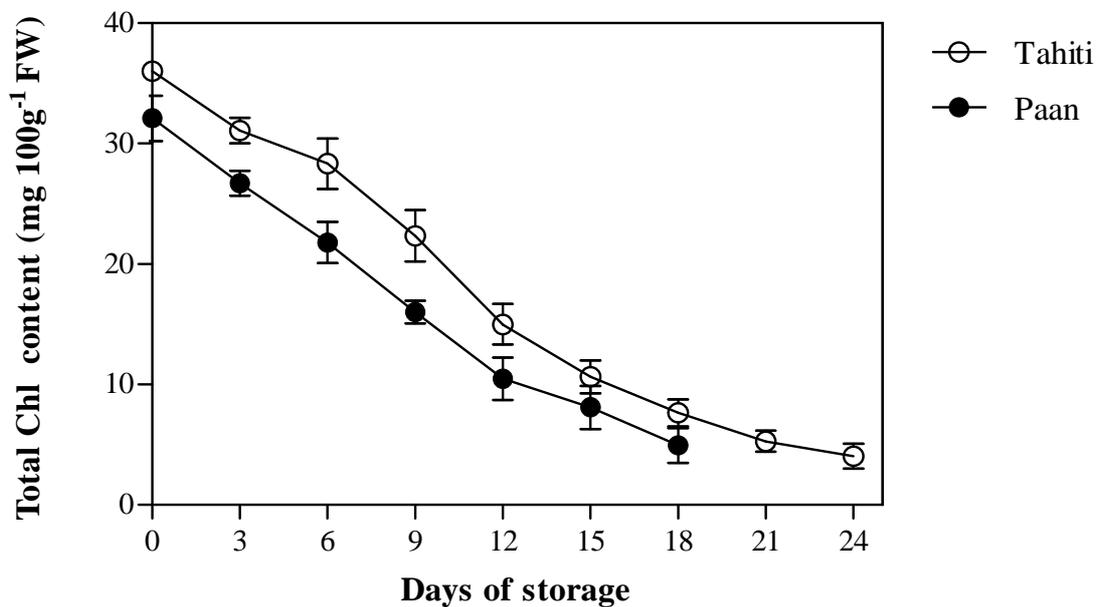
ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในเปลือกมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ จากผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์เอมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนหมดอายุการเก็บรักษาในวันที่ 18 ในมะนาวพันธุ์แป้น และวันที่ 24 ในมะนาวพันธุ์ตาฮิติ (รูปที่ 4.7) โดยการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเปลือกมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีการลดลงช้ากว่ามะนาวพันธุ์แป้น โดยในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาพบว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เท่ากับ $2.63 \text{ mg}/100 \text{ g FW}$ และมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เท่ากับ $1.50 \text{ mg}/100 \text{ g FW}$ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์เอยังมีค่ามาก แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของมะนาวที่พัฒนาจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองได้มากขึ้น จากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก.6)



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.6 ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

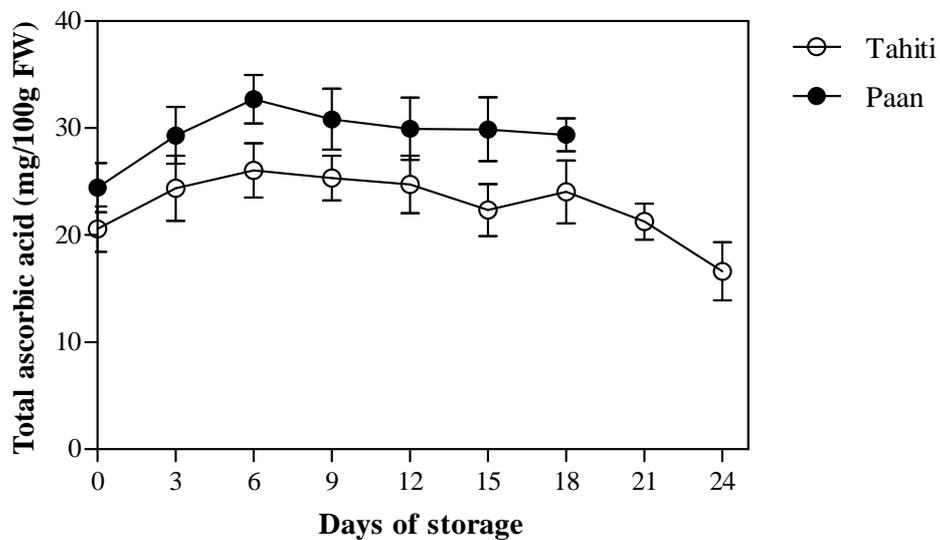
ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในเปลือกมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติ จากผลการทดลอง พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนหมดอายุการเก็บรักษาในวันที่ 18 ในมะนาวพันธุ์แป้น และวันที่ 24 ในมะนาวพันธุ์ตาฮิติ (รูปที่ 4.8) โดยการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดในเปลือกมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีการลดลงช้ากว่ามะนาวพันธุ์แป้น โดยในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาพบว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด เท่ากับ $4.93 \text{ mg}/100 \text{ g}$ FW และมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด เท่ากับ $3.05 \text{ mg}/100 \text{ g}$ FW จากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ก.7)



รูปที่ 4.8 ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.7 ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด (Total ascorbic acid)

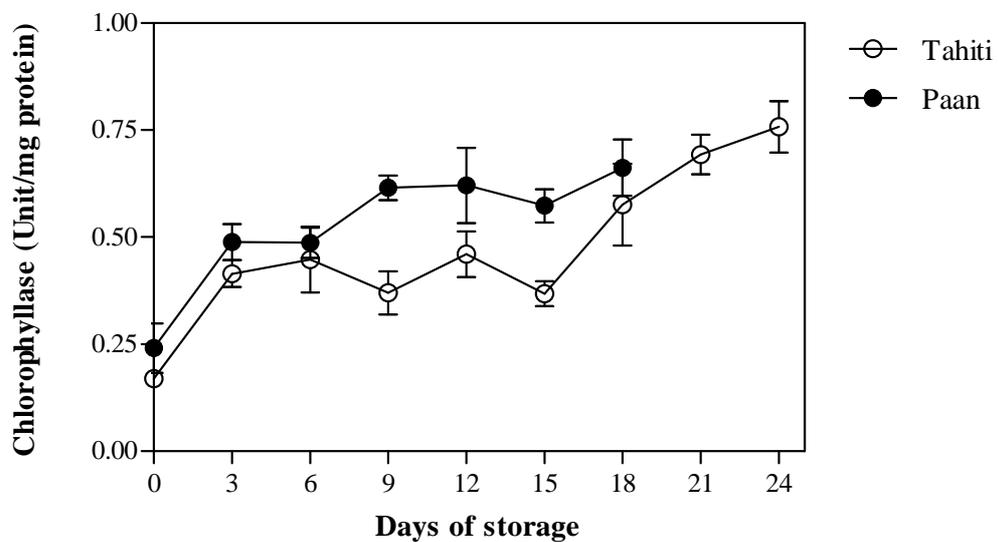
การเปลี่ยนแปลงปริมาณวิตามินซีทั้งหมดของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาดิพิพบว่าปริมาณวิตามินซีทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงสุดในวันที่ 6 ของการเก็บรักษาในมะนาวพันธุ์แป้นหลังจากจากมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณวิตามินซีทั้งหมดในมะนาวพันธุ์ตาดิพิมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วง 18 วันแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นก็มีค่าลดลงจนสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (รูปที่ 4.9) โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ภาคผนวก ก.8)



รูปที่ 4.9 ปริมาณวิตามินซีทั้งหมดของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้นและพันธุ์ตาดิพิ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.8 กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase*

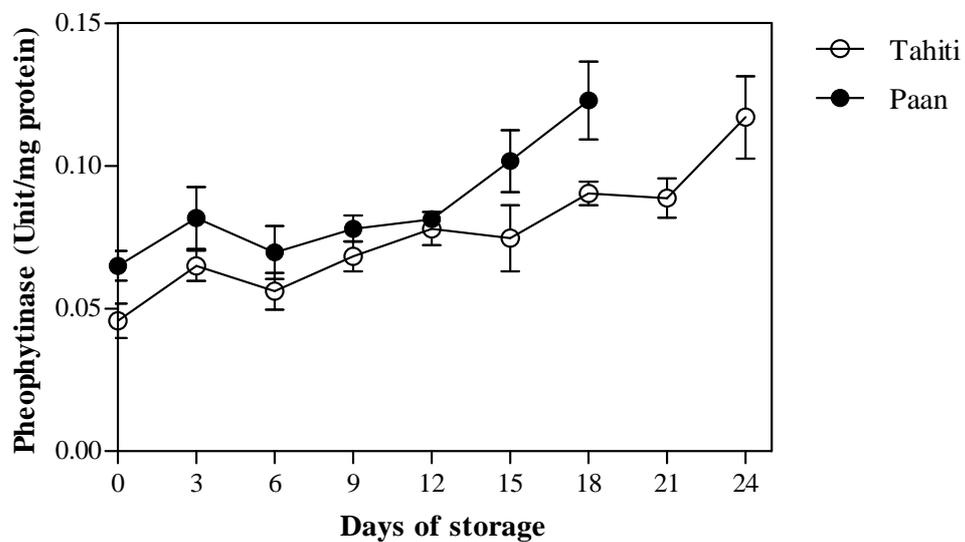
การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* ในมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติจากผลการทดลองพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในวันที่ 18 ในมะนาวพันธุ์แป้น และวันที่ 24 ในมะนาวพันธุ์ตาฮิติ โดยในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาพบว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.66 \text{ Unit/mg protein}$ และพันธุ์ตาฮิติมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* เท่ากับ $0.57 \text{ Unit/mg protein}$ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 4.10) (ภาคผนวก ก.9)



รูปที่ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* ของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.1.9 กิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase*

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติ จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในวันที่ 18 ในมะนาวพันธุ์แป้น และวันที่ 24 ในมะนาวพันธุ์ตาฮิติ โดยในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาพบว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าพันธุ์ตาฮิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ $0.12 \text{ Unit/mg protein}$ และพันธุ์ตาฮิติมีกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* เท่ากับ $0.09 \text{ Unit/mg protein}$ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 4.11) (ภาคผนวก ก.10)

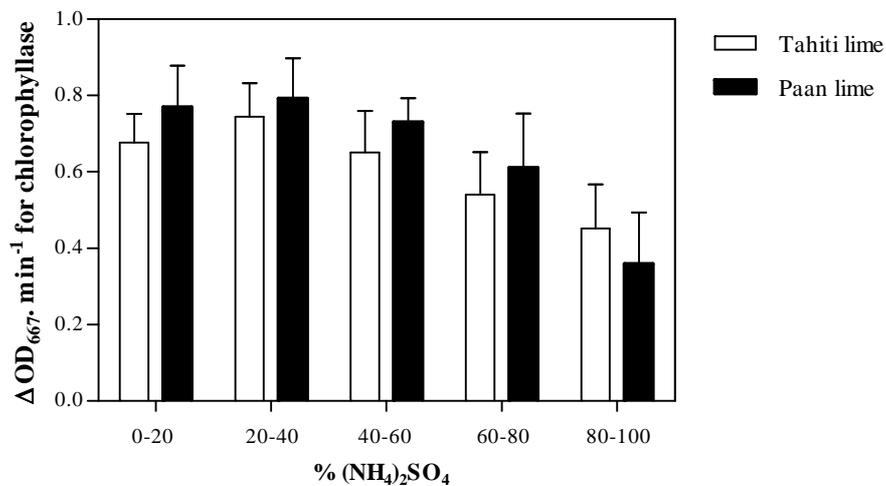


รูปที่ 4.11 กิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

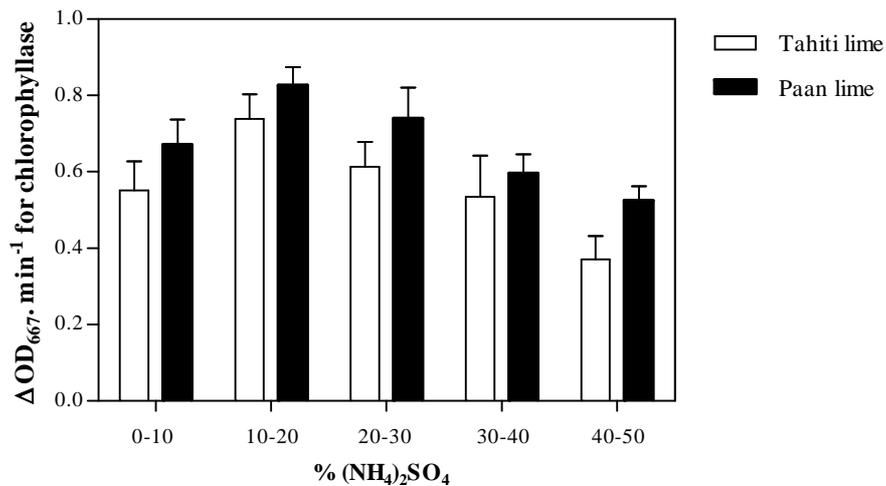
4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ที่สกัดได้จากเปลือกมะนาว สายพันธุ์แป้น และสายพันธุ์ตาฮิติ ศึกษาการทำปฏิกิริยาซึ่งเก็บตัวอย่างเปลือกมะนาวที่เหลืองสมบูรณ์ (เหลือง 100 เปอร์เซ็นต์ ของผิวเปลือก) จากการทดลองที่ 1 โดยเก็บตัวอย่างในรูป *acetone powder* เพื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยใช้ *ammonium sulfate* ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* โดยผลการทดลองดังต่อไปนี้

4.2.1 การทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* โดยใช้ *ammonium sulfate* ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองสกัดเอนไซม์ *chlorophyllase* โดยใช้ *ammonium sulfate* ที่ช่วงระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์เพื่อทำให้โปรตีนตกตะกอน ผลการทดลองพบว่าระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่มีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีนอยู่ในช่วง 0-60 เปอร์เซ็นต์ มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ (รูปที่ 4.12) จากช่วงความเข้มข้น 0-60 เปอร์เซ็นต์ ดังกล่าวจึงนำมาศึกษาช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* เพิ่มเติม คือ 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 และ 40-50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนดีที่สุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์ *chlorophyllase* สูงสุด ซึ่งพบว่าระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 10-20 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนในมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติดีที่สุด และมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* มากที่สุด (รูปที่ 4.13)



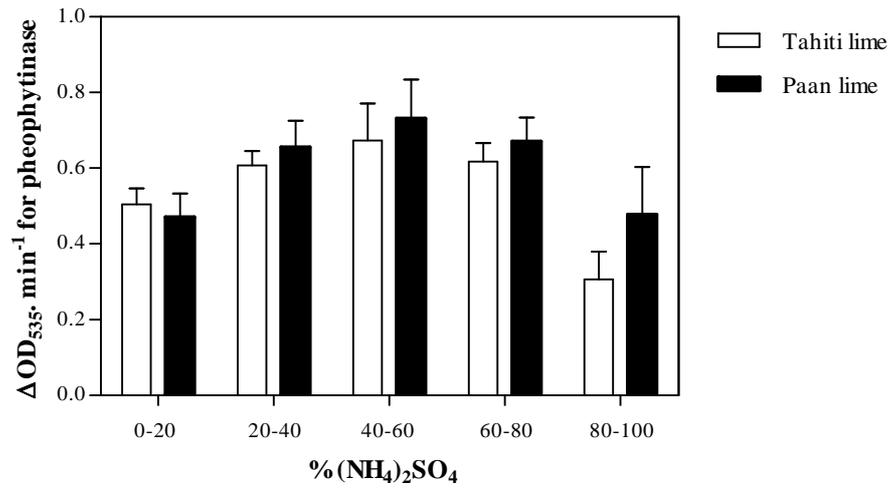
รูปที่ 4.12 การทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติโดยใช้ *ammonium sulfate*



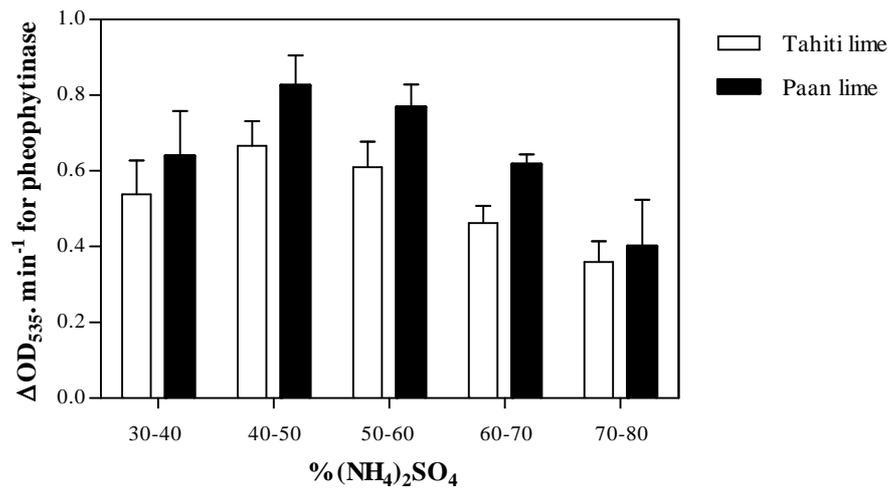
รูปที่ 4.13 การทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีตีโดยใช้ *ammonium sulfate*

4.2.2 การทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* โดยใช้ *ammonium sulfate* ((NH₄)₂SO₄) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์

การทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* โดยใช้ *ammonium sulfate* ที่ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์พบว่าช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่มีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีนและมีกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* สูงที่สุดอยู่ในช่วง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮีตี (รูปที่ 4.14) และทำการศึกษาเพิ่มเติมในระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ได้แก่ 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 40-50 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อการตกตะกอนโปรตีนในมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮีตีดีที่สุด และมีกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* มาก (รูปที่ 4.15)



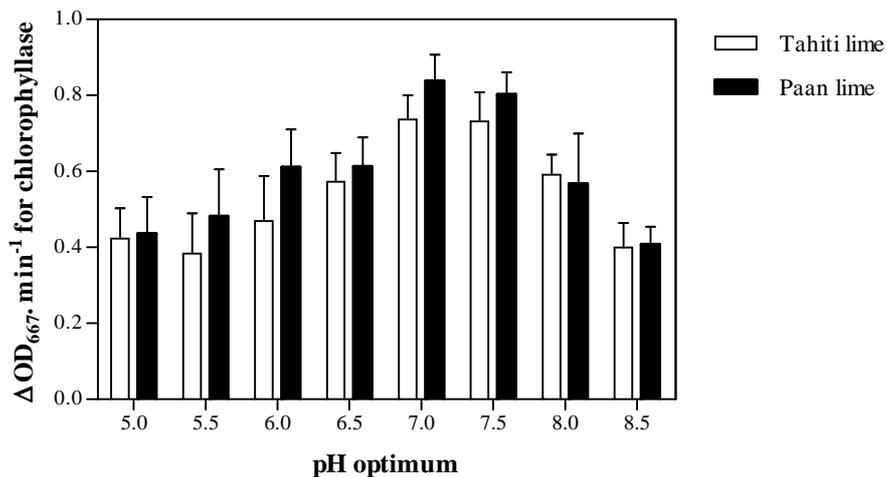
รูปที่ 4.14 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาอิตีโดยใช้ *ammonium sulfate*



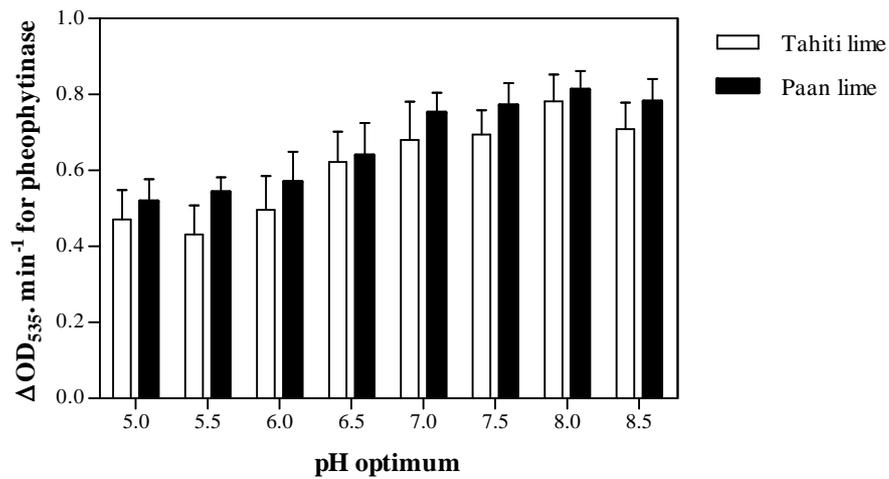
รูปที่ 4.15 การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาอิตีโดยใช้ *ammonium sulfate*

4.2.3 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ดังนี้ พีเอชที่เหมาะสม (*pH optimum*) ต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase*

จากผลการทดลองระดับพีเอชต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* พบว่าการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อ *pH* ของสารละลาย phosphate buffer (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเมื่อ *pH* เท่ากับ 7.0 หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* ก็เริ่มลดลงและต่ำสุด เมื่อ *pH* เท่ากับ 8.5 โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาสี (รูปที่ 4.16) ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อ *pH* ของ phosphate buffer (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เท่ากับ 8.0 และมะนาวพันธุ์แป้นจะมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาสี (รูปที่ 4.17)



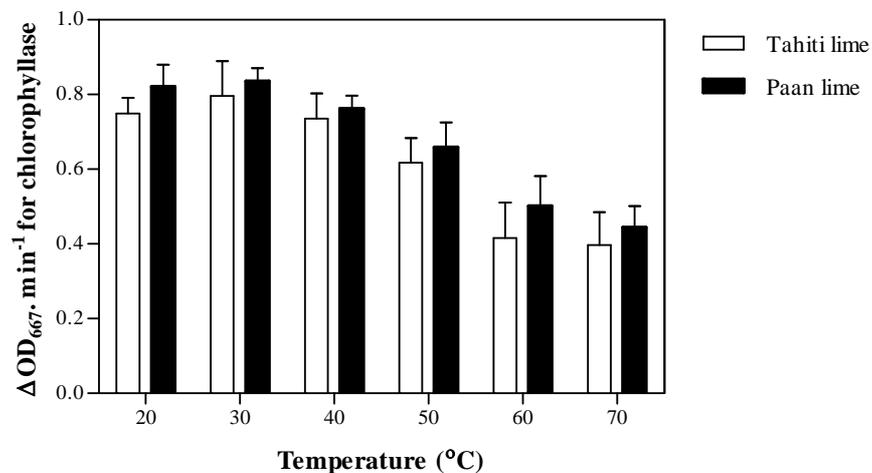
รูปที่ 4.16 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาสี



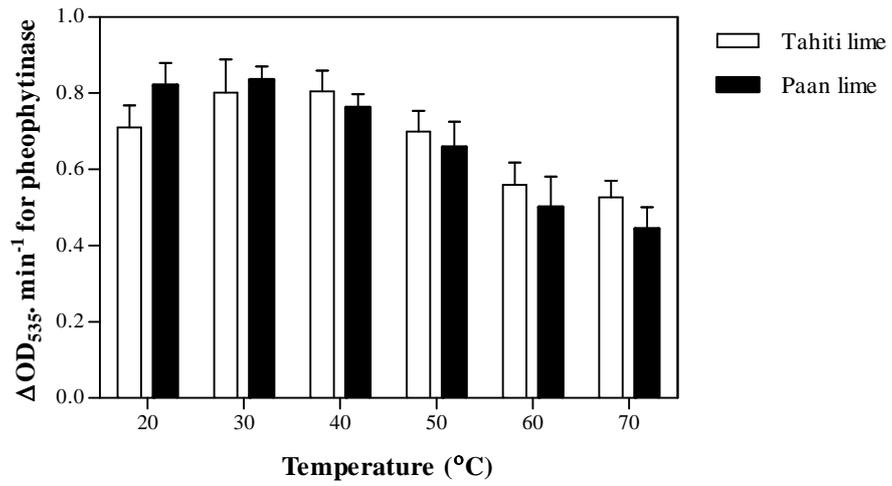
รูปที่ 4.17 พืชที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีตี

อุณหภูมิที่เสถียร (*temperature stability*) ต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase*

จากการทดลองอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* แตกต่างกันได้แก่ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* มีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* สูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮีตี (รูปที่ 4.18) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีตีเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสูงขึ้น กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* มีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 4.19)



รูปที่ 4.18 อุณหภูมิที่เสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีตี



รูปที่ 4.19 อุณหภูมิที่เสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *phaeophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาสี

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาดิ

การศึกษาลักษณะทางเคมีและทางกายภาพของมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาดิ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อทำการเก็บรักษามะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นระยะเวลาเวลานานขึ้นทำให้มีการสูญเสียน้ำหนักสดเพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยการสูญเสียน้ำหนักสดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจากค่าเริ่มต้นของวันแรกในการเก็บรักษา ซึ่งการสูญเสียน้ำหนักสดของมะนาวพันธุ์แป้นมีการสูญเสียน้ำหนักสดสูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาดิ โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีอายุการเก็บรักษา 18 วัน และในส่วนของมะนาวพันธุ์ตาดิมีอายุการเก็บรักษา 24 วัน การสูญเสียน้ำหนักสดของมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีอายุการเก็บรักษานานขึ้นการสูญเสียน้ำหนักสดก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย โดยทั่วไปผลไม้จะสูญเสียในรูปของไอน้ำซึ่งมีช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช โดยการแพร่ออกทางช่องเปิดธรรมชาติ การสูญเสียน้ำของพืชเกิดจากการคายน้ำซึ่งเกิดตลอดเวลา การคายน้ำนอกจากทำให้ น้ำหนักผลผลิตลดลงแล้วยังทำให้รสชาติของผลิตผลด้อยลงด้วยโดยเฉพาะเนื้อสัมผัส (Texture) ในส่วนของมะนาวมีการสูญเสียน้ำโดยการแพร่ออกทางช่องเปิดธรรมชาติ ที่เรียกว่า stomata (Kaewsuksaeng et al., 2011) พืชตระกูลส้มมักมีการสูญเสียน้ำเร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น เนื่องจากชั้น albedo ในเปลือกของผลไม้ชนิดนี้ ประกอบด้วย spongy cell โดยใน ระยะ mature เซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ มีช่องว่างระหว่างเซลล์มาก ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าผลไม้ชนิดอื่น การเก็บรักษามะนาวที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยลดการสูญเสียน้ำได้ (จริงแท้ ศิริพานิช, 2538) นอกจากนี้การสูญเสียน้ำหนักสด เกิดจากการคายน้ำจากกระบวนการหายใจ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ามะนาวพันธุ์แป้นมีอัตราการหายใจที่สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาดิ จึงส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักสดที่สูงกว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

เมื่อทำการเก็บรักษาผลมะนาวเป็นระยะเวลาเวลานานขึ้น ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเนื่องจากการสูญเสียน้ำไประหว่างการเก็บรักษา ทำให้ความเข้มข้นของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น (จริงแท้ ศิริพานิช, 2540) และผลมะนาวเป็นผลไม้กลุ่ม non-climacteric fruit มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อยและต้องใช้เวลาช่วงระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลง (दनัย บุญเกียรติ, 2534) ปริมาณกรดที่โดดเด่นได้มีค่าคงที่ใกล้เคียงของมะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลมะนาวจัดเป็นผลไม้ชนิด non-climacteric fruit ซึ่งมีอัตราการหายใจและเมตาบอลิซึมภายในผลค่อนข้างคงที่ (สายชล เกตุษา, 2528) จึงมีการเปลี่ยนแปลงกรดภายในผลน้อย ส่วนปริมาณวิตามินซีมีลักษณะคงที่ ไม่มีความ

แตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับกรดภายในผลผลมะนาว และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงทำให้สูญเสียวิตามินซีได้มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (สายชล เกตุษา, 2528)

การเปลี่ยนแปลงสีของมะนาว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติ พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นสีเปลือกของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติมีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง (ค่า L^* มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า Hue ลดลง) โดยมะนาวพันธุ์แป้นมีการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกเกิดขึ้นเร็วกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ เนื่องจากมะนาวพันธุ์ตาฮิติมีสีเปลือกที่เขียวเข้ม ซึ่งมีปริมาณคลอโรฟิลล์เริ่มต้นสูงกว่ามะนาวพันธุ์แป้น ดังนั้นมะนาวพันธุ์แป้นจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองเร็วกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบอยู่ในเมมเบรนของคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนพลังงานแสงเป็นพลังงานเคมี ในพืชชั้นสูงรวมทั้งมะนาวพบอัตราส่วนของปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อคลอโรฟิลล์บี เป็น 3 ต่อ 1 โดยทั่วไปไปผลิตผลจะมีการสร้างและการสลายตัวของคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นตลอดเวลา แต่ในช่วงที่ผลิตผลเกิดการวายจะมีการสลายตัวของคลอโรฟิลล์มากกว่าการสร้าง (จริงแท้ สิริพานิช, 2546) จากการทดลองการเก็บรักษามะนาวทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาฮิติที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า มะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติมีการสลายตัวของคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนหมดอายุการเก็บรักษา โดยสังเกตได้จาก การเปลี่ยนสีเปลือกของมะนาวจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง การสลายตัวของคลอโรฟิลล์เกิดขึ้นได้หลายสภาวะ เช่น ในสภาพที่เป็นกรด และการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ (จริงแท้ สิริพานิช, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จิฎิมา ช่างทอง (2544) ศึกษาการเก็บรักษาผลการเก็บรักษาผลมะนาวไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิกักตุน (30 องศาเซลเซียส) พบว่าผลมะนาวเกิดการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ภายในผลิตผล มีการผันแปรตามอุณหภูมิ โดยค่าอุณหภูมิสูงอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้เร็วขึ้น และส่งผลให้ผลิตผลมีอายุการเก็บรักษาลดลง (จริงแท้ สิริพานิช, 2541)

การสลายตัวของคลอโรฟิลล์เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาฮิติ พบว่าเมื่อมะนาวมีระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นสีเปลือกของมะนาวเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกมะนาวสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* เมื่อมะนาวมีอายุการเก็บรักษานานขึ้นกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกันโดยสมมุติฐานกลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในมะนาว คือ เอนไซม์ *chlorophyllase* จะ *hydrolyze* หมู่ *Phytol* ของโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ ทำให้ส่วน

ทาง *phytol* หลุดออกจากโมเลกุลคลอโรฟิลล์ได้เป็น *chlorophyllide a* นอกจากนี้ *chlorophyllase* ใปย่อยอนุพันธ์ของ *pheophytin* ซึ่งเกิดจากการดึงอะตอม Mg ออกจาก *pyrrole ring* โดย *Mg-dechelatase* และมีการทำงานควบคู่ไปกับ *pheophytinase* จนได้อนุพันธ์ *pheophorbide* ซึ่งอีกทางหนึ่งเอนไซม์ *Mg-dechelatase* จะมีการดึงอะตอมของ Mg ออกจากวงแหวน *chlorophyllide a* ระยะเวลาสุดท้าย *pheophorbide a oxygenase (PaO)* จะทำงานร่วมกับเอนไซม์ *red chlorophyll catabolite reductase (RCC)* ในการปิดวงแหวน *phophyrin* ทำให้เป็น *primary fluorescent catabolite (pFCC)* ที่ไม่มีสีแต่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ (Takamiya et al., 2000) การที่คลอโรฟิลล์เปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี จึงปรากฏสีเหลืองหรือสีอื่นๆ จากผลการทดลองมะนาวพันธุ์แป้นมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ที่สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่อง ในมะนาวพันธุ์แป้นจึงทำให้เกิดการแสดงสารสีของคลอโรฟิลล์น้อย ซึ่งแสดงออกเป็นสีเหลืองเร็วกว่ามะนาวพันธุ์ตาฮิติ

5.2 ศึกษาการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ที่สกัดได้จากเปลือกมะนาว สายพันธุ์แป้น และสายพันธุ์ตาฮิติ

กระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลัก ที่เปลี่ยนคลอโรฟิลล์เอให้ไปเป็นสารที่ไม่มีสี โดยมี 3 ขั้นตอนได้แก่ในขั้นตอนแรกเอนไซม์ *chlorophyllase* จะทำการย่อยอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์เอ ไปเป็น *chlorophyllide a* และหลังจากนั้นก็เอนไซม์ *Mg-dechelating substance* มาสลายอนุพันธ์ให้ไปเป็น *pheophorbide a* จากนั้นเอนไซม์ *pheophorbide a oxygenase* สลายอนุพันธ์ต่อไปเป็น *red chlorophyll catabolite* จากนั้นเอนไซม์ *red chlorophyll catabolite reductase* จะสลายอนุพันธ์สุดท้ายให้มาเป็นอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติไม่เสถียร ไม่มีสี และมีขนาดโมเลกุลต่ำและในขณะเดียวกันเอนไซม์ *Mg-dechelating substance* ก็สามารถมาทำการย่อยอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ก่อนได้โดยจะย่อยอนุพันธ์ *chlorophyllide a* ไปเป็น *pheophytin a* และจากนั้นเอนไซม์ที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับการสลายอนุพันธ์ได้แก่ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* มาย่อยอนุพันธ์ให้เปลี่ยนไปเป็น *pheophorbide a* จากนั้นก็จะเข้าสู่กระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการ และอีกเช่นเดียวปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถมากระตุ้นอนุพันธ์ของ *chlorophyll a* ให้เปลี่ยนไปเป็นสารที่ไม่มีสีได้อีกเช่นกัน (Aimla-or et al., 2011) ดังนั้นจึงมีการศึกษากระบวนการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ เอนไซม์ *chlorophyllase* เป็นตัวสำคัญในการสลายอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ และเอนไซม์ *pheophytinase* ซึ่งไม่ค่อยมีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้มากนักแต่เอนไซม์ *pheophytinase* สามารถทำหน้าที่ เช่นเดียวกับกับเอนไซม์ *chlorophyllase* โดยสามารถใช้สารตั้งต้นตัวเดียวกัน คือ *phophytin a*

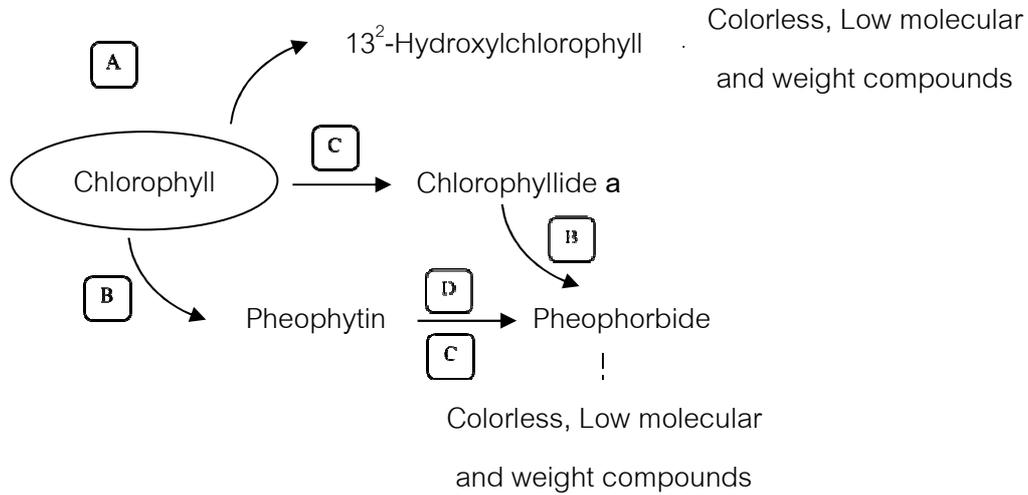
จากการทดลองพบว่าการสกัดเอนไซม์ *chlorophyllase* โดยใช้ *ammonium sulfate* ที่ช่วงความเข้มข้น 0-100 เปอร์เซ็นต์ มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาดิมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* สูงสุด ในช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกับเอนไซม์ *pheophytinase* ทั้งมะนาวพันธุ์ตาดิและมะนาวพันธุ์แป้น มีการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 40-50 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองระดับที่เอชต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* พบว่าการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อ pH ของสารละลาย *phosphate buffer* (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อ pH เท่ากับ 7.0 ซึ่งมะนาวพันธุ์แป้นจะมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงกว่ามะนาวพันธุ์ตาดิ ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* จะมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อ pH ของ *phosphate buffer* (50 mM KCl และ 0.12% TritonX-100) เท่ากับ 8.0 ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาดิ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* มีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* สูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและมะนาวพันธุ์ตาดิ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาดิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ *Aiamla-or et al. (2011)* ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* ในบดลือกโคลีโดยใช้ *ammonium sulfate* อิมตัวสำหรับทำให้โปรตีนตกตะกอน โดยพบว่าการใช้ *ammonium sulfate* ที่ช่วงความเข้มข้น 20-40 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* สูง ในส่วนของกิจกรรมของเอนไซม์ *pheophytinase* พบว่าการใช้ *ammonium sulfate* ที่ช่วงความเข้มข้น 40-60 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าช่วงระดับความเข้มข้นอื่น ดังนั้นจากการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นเอนไซม์หรือโปรตีนต่างชนิดกัน และมีคุณลักษณะทางเคมีที่แตกต่างกัน ในเรื่อง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเคมี ถึงแม้ว่าจะมีการใช้สารตั้งต้นชนิดเดียวกัน อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้มีการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของคลอโรฟิลล์ในบร็อคโคลี ได้แก่ *Mg-dechelating substance* โดยใช้ความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ความเข้มข้น 20-60 เปอร์เซ็นต์ ให้กิจกรรมสูงสุด pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เสถียรในการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส (*Kaosamphan et al., 2010*)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาดิธิ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามะนาวพันธุ์ตาดิธิ (อายุการเก็บรักษา 24 วัน) มีอายุการเก็บรักษานานกว่ามะนาวพันธุ์แป้น (อายุการเก็บรักษา 18 วัน) และมะนาวพันธุ์ตาดิธิมีการเปลี่ยนแปลงการสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก (ค่า *L* และ *Hue*) ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ คลอโรฟิลล์ทั้งหมด กิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* โดยมะนาวพันธุ์ตาดิธิมีการเปลี่ยนแปลงช้ากว่ามะนาวพันธุ์แป้น
2. มะนาวพันธุ์แป้นมี ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในน้ำคั้น และ ปริมาณวิตามินซีทั้งหมด มีการเปลี่ยนแปลงที่ต่ำกว่ามะนาวพันธุ์ตาดิธิ
3. มะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์ตาดิธิมีกิจกรรมเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* สูงสุดในช่วงระดับความเข้มข้นของ *ammonium sulfate* ที่ 20-40 เปอร์เซ็นต์ และ 40-50 เปอร์เซ็นต์
4. pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* เท่ากับ 7.0 ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ *pheophytinase* pH เท่ากับ 8.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *chlorophyllase* เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ *pheophytinase* เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ทั้งมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาดิธิ

กลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในมะนาว สามารถสรุปได้ดังกระบวนการดังนี้



รูปที่ 6.1 กลไกการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในมะนาว

A: Chlorophyll-degrading peroxidase (Kaewsuksaeng et. al., 2010)

B: Mg-dechelating substance (Kaewsuksaeng et. al., 2011)

C: Chlorophyllase

D: Pheophytinase

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองพบว่าเมื่อเก็บรักษามะนาวเป็นระยะเวลานานขึ้น เปลือกมะนาวจะเกิดการเหี่ยว เนื่องจากการสูญเสียน้ำ ดังนั้นควรมีการประยุกต์ใช้ฟองก๊าซ 1-MCP ร่วมกับบรรจุภัณฑ์แบบสภาพบรรยากาศตัดแปลง ในการควบคุมคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยว
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ของเอนไซม์ *chlorophyllase* และ *pheophytinase* เพื่อสามารถแยกได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ นำมาสู่การหาขนาดโมเลกุลและลำดับอะมิโน (*amino sequence*) ต่อไป
3. จากผลการทดลองการทำบริสุทธิ์เอนไซม์บางส่วนทำให้ทราบคุณลักษณะทางเคมี ได้แก่ *pH* และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ จึงสามารถศึกษาผลของอุณหภูมิ ได้แก่ การใช้ความร้อน ในการชะลอสลายตัว และควบคุมการเหลืองของมะนาว เพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554, ศูนย์ข้อมูลและข่าวสารการส่งออกมะนาว, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 28 หน้า.
- กนกมณฑล ศรศรีวิชัย, 2526, การเก็บรักษาผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว, เทคโนโลยีและสรีรวิทยาภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 90 หน้า.
- กัณฑ์ธีร์ สิริเวชพันธุ์ และลำแพน ขวัญพูล, 2555, ผลของสาร 1-MCP ต่อการเปลี่ยนแปลงสีผิวและคุณภาพของมะละกอพันธุ์แขกดำและพันธุ์ปลักไม้ลาย, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, ปีที่ 43, หน้า 436-439.
- จริงแท้ สิริพานิช, 2537, วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้, ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 307 หน้า.
- จริงแท้ สิริพานิช, 2538, สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้, โรงพิมพ์ศูนย์และฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม. 396 หน้า.
- จริงแท้ สิริพานิช, 2553, ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช, โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, 194 หน้า.
- ณัฐวดี มาสกรานต์และวราภา মহากาญจนกุล, 2545, การลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* บนเปลือกบนผักด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, ปีที่ 33, ฉบับที่ 6, หน้า 214-218.
- दनัย บุญเกียรติ, 2540, สรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน, ภาควิชาพืชสวนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 225 หน้า.
- दनัย บุญเกียรติ และนิธิยา รัตนานพนนท์, 2531, การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 154 หน้า.
- นุกูล เพ็ญพ่ายพ, 2532, ผลของปัจจัยทางเคมีและกายภาพต่อคุณภาพของผลมะนาวที่เก็บแช่เย็นในบรรยากาศตัดแปลง, วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 121 หน้า.
- นิภา คุณทรงเกียรติ, 2541, เอกสารประกอบการสอน วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. 294 หน้า.

นิภาคุณทรงเกียรติ, 2540, การเก็บรักษามะนาว, วารสารเกษตรก้าวหน้า, ฉบับที่ 5, หน้า 7-9.

พีรเดช ทองอำไพ, 2537, ฮอว์โมนพืชและสารสังเคราะห์แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, วิชาการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 หน้า.

ประเทือง สง่าวงศ์, 2533, โรคพืชวิทยา, ชมพู่การพิมพ์, เชียงใหม่. หน้า 488-494.

ศุภกิจ แก้วถนอม, 2540, การปลูกมะนาว, อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

สายชล เกตุษา, 2528, สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้, โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 364 หน้า.

อภิญา เจริญกุล, 2537, การเก็บรักษามะนาวสดโดยการบรรจุแต่ละผลในฟิล์มพลาสติก, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 154 หน้า.

Abeles, F.B., Morgan, P. and Saltveit, M.E., 1992, Ethylene in Plant Biology, 2 edition, Academic Press, San Diego, CA.*

Albeles, F.B., Dunn, L.J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R.E. and Schmidt, J. 1988, "Introduction of 33-kD and 60-kD peroxidase during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons", Plant Physiology, Vol.87, pp. 609-615.

Aiamla-or, S., Tetsuya, N., Shigyo, M., and Yamauchi, N., 2012, "Pheophytinase activity and gene expression of chlorophyll degrading enzymes relationg to UV-B treatment in postharvest broccoli (Brassica oleracea L. Italica Group) florets", Postharvest Biology and Technology, Vol. 63, pp. 60-66.

Amir-Shapira, D., Goldschmidt, E.E. and Altman, A, 1987, "Chlorophyll Catabolism in Senescing Plant Tissues : in Vivo Breakdown Intermediates Suggest Different Degradative Pathways for Citrus Fruit and Parsley Leaves", Proceeding of National Academic Science, Vol. 84, pp. 1901-1905.

Arkus, K.A.J., Cahoon, E.B., Jez, J.M., 2005, "Mechanistic Analysis of Wheat Chlorophyllase", Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 438, pp. 146-55.

Bortlik, K., Peisker, C. and Matile, p., 1990, "A novel type of chlorophyll catabolite in senescent barley leaves", Journal of Plant Physiology, Vol. 136, pp. 311-319.

Brannlage, W.J., Greene, D.W., Aution, W.R. and McLanghlin, J.M., 1980, "Effect of aminoethoxyvinylglycine on internal ethylene concentration and storage of apple", Journal of American Society for Horticultural Science, Vol. 105, pp. 847-85.

Bradford, M.M., 1976, "A Dye Binding Assay for Protein", Analytical Biochemistry, Vol. 72, pp. 248-254.

Costa, H., Gallego, S. M., and Tomaro, M. L., 2002, "Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons", Plant Science, Vol. 162, pp. 939-945.

Drazkiewicz, M. 1994, "Chlorophyll: Occurrence function mechanism of action effects of external and internal factors", Photosynthetica, Vol. 30, pp. 350 – 382.

Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E.C. and Goren, R., 2000, "Control of ethylene responses in avocado fruit with 1-methylcyclopropene", Postharvest Biology and Technology, Vol. 20, pp.143-150.

Ganoza, V.G. and McFeeters, R.F.1976, "Chlorophyllase activity during pigmentation changes in Chlorella protothecoides", Photosynthetica, Vol.10, pp. 1-6.

Gross, J., 1991, "Pigment in Vegetable : Chlorophyll and Carotenoid", Plant Growth Regulation, Vol. 18, pp. 79-86.

Heaton, J.W. and Maragoni, A.G. 1996, "Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues", Trends in Food Science and Technology, Vol. 2, pp. 117-118.

Hirschfeld, K. R., and Goldschmidt, E. F., 1983, "Chlorophyllase activity in chlorophyll-free citrus chloroplast", Plant cell Reports, Vol. 2, pp. 117-118.

Hörtensteiner, S., and Kräutler, B., 2000, "Chlorophyll breakdown in oilseed rape", Photosyn, Vol. 64, pp. 37-146.

Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldsmidt, E.E., Riov, J. and Eyal, Y., 1999, "Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and function expression of Chlasel gene from ethylene-treated citrus fruit and its regulation during development", The Plant Journal, Vol. 20, pp. 653-661.

Kader, A.A. and Arpaia, M.L. 1992, "Postharvest handling systems: Subtropical fruit", In *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, Kader et al. (Ed), Division of Agriculture and Natural Resources University of California, pp. 233-240.

Kaewsuksaeng, S., Yamauchi, N., Funamoto, Y., Aiamla-or, S., Mori, T., Shigyo, M., and Kanlayanarat, S., 2010, "Partially purification of Mg-dechelataase in relation to chlorophyll degradation in broccoli (*Brassicaoleracea L. Italica Group*) florets", *ActaHorticulturae*, Vol. 875, pp. 509 – 514.

Kaewsuksaeng, S., 2011, "Chlorophyll degradation in horticultural crops", *Walailak Journal Science and Technology*, Vol. 8, pp. 9-19. (Review).

Kende, H., Acaster, M.A., Jones, J.F. and Metraux, J.P., 1982, "On the mode action of ethylene in *Plant Growth Substances*", Edited by Wareing, P.F., Academic Press, London, pp. 269-277.

Kunieda, T., Amano, T. and Shioi, Y., 2005, "Search for chlorophyll degradation enzyme Mg-dechelataase, from extracts of *Chenopodium album* with native and artificial substrates", *Plant Science*, Vol. 169, pp. 177–183.

Langmeier, M., Ginsburg, S., and Matile, P., 1993, "Chlorophyll breakdown in senescent leaves: demonstration of Mg-dechelataase activity", *PhysiologiaPlantarum*, Vol. 89, pp. 347-353.

Matileet, P., Schellenberg, M. and Vicentini, F., 1996, "Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope", *Planta*.Vol. 201, pp. 96–99.

Moll, W.A.W., De, W.B. and Lutter, R., 1978, "Chlorophyllase activity in developing leaves of *Phaseolus vulgaris L*", *Planta*, Vol.139, pp.79-83.

Nguyen-the, C. and Carlin, F., 1994, "The microbiology of minimally processed fresh and vegetables", *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, Vol. 34, No.4, pp.371-401.

Roe, J.H., Mills, M.B., Oesterling, M.J., and Damron, C.M., 1948, "The determination of diketo-l-gulonic acid, dehydro-l-ascorbic acid, and l-ascorbic acid in the same tissue extract by the 2,4-dinitrophenylhydrazine method", *Biol. Chem.*, Vol.174, pp.201-208.

Romani, R., Puschmann, R., Finch, J. and Bentel, J., 1982, "Effect of preharvest application of AVG on ripening of bartlett pears with and without cold storage", *HortScience*, Vol. 17, pp. 214-215.

Schelbert, S., Aubry, S., Burla, B., Agne, B., Kessler, F., "Krupinska, K., and Hörtensteiner, S., 2009, "Pheophytinpheophorbide hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*", *Plant Cell*. Vol. 21, pp. 767 – 785.

Serek, M., Sisler, E.C. and Reid, M.S., 1994, "Wave1 gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effect in potted flowering plants", *Journal of American Society for Horticultural Science*", Vol. 119, pp. 1230-1233.

Shioi, Y., Tomita, N., Tsuchiya, T., and Takamiya, K., 1996, "Conversion of chlorophyllide to pheophorbide by Mg-dechelating substance in extracts of *Chenopodium album*", *Plant Physiol. Biochem*, Vol. 34, pp. 41 – 47.

Srilaong, V., Aiamla-or, S., Soontornwat, A., Shigyo, M., and Yamauchi, N., 2011, "UV-B irradiation retards chlorophyll degradation in lime (*Citrus latifolia* Tan.) fruit", *Postharvest Biol. Technol.*, Vol. 59, pp. 110–112.

Spiegel-Roy, P. and Goldschmidt, E.E., 1996, "Biology of citrus", Cambridge university press, 230 p.

Stoother, J, 1970, "Markets for Fresh Lime", Report, Tropical Products Institute, London, 55 p.

Suzuki, T., Kunieda, T., Murai, F., Morioka, S., and Shioi, Y, 2005, "Mg-dechelation activity in radish cotyledons with artificial and native substrates Mg-chlorophyllin a and chlorophyllide a", *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 43, pp. 459 – 464.

Takahashi, M.; Chiba, K. & Li, P., 2007, "Formation of hydroxyl radicals by collapsing ozone microbubbles under strongly acidic conditions", *Journal of Physical Chemistry B*, Vol.111, No.14, pp. 11443-11446.

Takamiya, K., Tsuchiya, T. and Ohta, H., 2000, "Degradation pathways of chlorophyll: What has gene cloning revealed", *Journal of Plant Science*, Vol. 5, pp. 426-431.

Taylor, A.O. and Craig, A.S., 1971, "Plants under climatic stress low temperature high light effects on chloroplast ultrastructure", Plant Physiology, Vol.47, pp.719-725.

Ting, S.V., and Attaway, J.A., 1980, "Citrus Fruits", In A.C. Hulme(ed.), The Biochemistry of Fruits and their Products, Academic Press, London, Vol. 2., pp. 107 – 161.

Ting, S. V., and Rouseff, R., L., 1986, "Citrus Fruits and Their Products: Analysis and Technology", Marcel Dekker, New york, 293 p.

Trebitsh, T., Goldschmidt, E.E. and Riov, J.,1993, "Ethylene induce de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in citrus fruit peel", Proceeding of National of Academy Science of the United States of America, Vol. 90, pp. 9441-9445.

Wills, R.H.B., McGlasson, B., Graham, D. and Joyce, D., 1998, "Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit", Vegetables and Ornamentals, UNSW Press Sydney, pp. 262.

Yamauchi, N. and Watada, A. E., 1991, "Regulate chlorophyll degradation in spinach leaves during storage", Journal of the American Society for Horticultural Science, Vol. 116, pp. 58-62.

Yamauchi, N, Funamoto, Y and Shigyo, M., 2004, "Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops", Phytochem, Reviews, Vol. 3(1-2), pp. 221–228.

ตารางภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ก.1 การสูญเสียน้ำหนักสดของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Weight loss								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	0	1.43a	2.17	2.71	2.59	3.60	4.42	-	-
Tahiti lime	0	0.74b	1.71	2.39	2.96	3.86	3.81	3.63	3.6433
F-test	-	*	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	0	21.02	14.37	16.82	0.39	11.11	15.88	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกันหมายถึงข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตารางที่ ก.2 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง L* value ของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	L*								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	43.63	48.10	58.57a	59.78a	65.11a	70.41a	69.65	-	-
Tahiti lime	41.06	42.65	44.45b	46.98b	49.45b	54.05b	61.48	72.36	85.92
F-test	NS	NS	*	*	*	*	NS	-	-
C.V. (%)	9.18	9.46	10.17	10.36	7.84	9.99	10.59	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกันหมายถึง

ข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตารางที่ ก.3 การเปลี่ยนแปลงค่า Hue angle ของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติ ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Hue angle value								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	114.05	113.59	111.44	110.68	107.12	100.14	95.76	-	-
Tahiti lime	116.99	116.70	114.67	107.55	104.85	106.56	100.90	94.75	89.52
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	2.82	2.12	4.03	2.10	3.06	4.64	3.06	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ก.4 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตจากน้ำคั้นเนื้อของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาสีติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Titratable acidity								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	4.23	4.66	4.76	5.23	5.10	5.36a	5.33	-	-
Tahiti lime	4.10	4.16	4.33	4.50	4.33	4.26b	4.30	4.76	4.33
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	**	*	-	-
C.V. (%)	5.18	5.22	7.87	7.31	8.11	5.81	5.93	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

** คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกันหมายถึงข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตารางที่ ก.5 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้จากน้ำคั้นของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาสีติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Total soluble solid								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	4.23	6.33	6.33	6.66	6.40	6.16	6.30	-	-
Tahiti lime	4.10	5.33	5.66	5.76	5.50	5.50	5.43	5.96	5.9000
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	5.18	9.89	9.62	13.91	11.39	16.32	12.13	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ก.6 ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Chlorophyll a content								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	22.65	19.29	18.19	11.20	6.78	5.16	2.63	-	-
Tahiti lime	27.26	23.71	21.89	16.20	10.47	7.03	5.10	3.09	1.50
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	9.71	12.46	16.05	16.25	24.28	26.50	48.44	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ก.7 ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของมะนาวพันธุ์แป้น และพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Total chlorophyll content								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	32.11	26.39b	21.78	16.01	10.48	8.10	4.93	-	-
Tahiti lime	36.00	31.08a	28.34	22.34	14.99	10.64	7.64	5.430	3.05
F-test	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	7.31	5.60	13.17	14.92	23.43	29.41	35.80	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกันหมายถึง

ข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตารางที่ ก.8 ปริมาณวิตามินซีทั้งหมดของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Total ascorbic acid								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	24.45	29.33	32.72a	30.82	29.95	29.89a	29.37a	-	-
Tahiti lime	20.56	24.38	26.05b	25.33	24.74	22.36b	24.05b	21.273	16.623
F-test	NS	NS	*	NS	NS	*	*	-	-
C.V. (%)	9.77	10.58	8.18	8.87	10.19	10.42	8.74	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* คือ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกันหมายถึง

ข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี

Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

ตารางที่ ก.9 กิจกรรมเอนไซม์ Chlorophyllase ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮิติในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Chlorophyllase activity								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	0.24	0.48	0.48	0.61	0.62	0.57	0.66	-	-
Tahiti lime	0.16	0.41	0.44	0.37	0.46	0.36	0.57	0.69	0.78
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	35.91	14.17	22.13	14.40	23.28	12.56	22.87	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ ก.10 กิจกรรมเอนไซม์ Pheophytinase ของมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์ตาฮีตีในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Treatment	Pheophytinase activity								
	Days of storage								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Paan lime	0.06	0.08	0.06	0.07	0.08	0.10	0.12	-	-
Tahiti lime	0.04	0.06	0.05	0.06	0.07	0.07	0.09	0.08	0.117
F-test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-	-
C.V. (%)	17.58	20.14	22.09	11.65	10.05	22.01	16.43	-	-

NS คือ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวก ข

วิธีคำนวณความเข้มข้น Ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

