บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุเกษตร

ผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sia Num Phueng) เก็บเกี่ยวที่ระยะความแก่ทางการค้า ขนาดผลเบอร์ 4-5 มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6.0-6.8 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 จากสวนของเกษตรกรในอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ บรรจุใส่กล่องและขนส่งโดยรถยนต์มาที่ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ทำการทดลองในวันรุ่งขึ้น

3.2 สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคเน่าราเขียนบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

- กรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% (5% peroxyacetic acid, food grade, Thaiperoxide Co. Ltd., Saraburi, Thailand)
- กรดเพอร์ออกซีซิตริก 5% (5% peroxycitric acid, food grade, Thaiperoxide Co. Ltd., Saraburi, Thailand)
- โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate, food grade, Hunan Prosicial and Exp Group Lisheng Co. Ltd., China)
- โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate, food grade, Ningbo Wanglong Group Co. Ltd., China)
- โพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ (potassium metabisulfite, food grade, WR Balston AG, Seelze, Germany)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและสารเคมีสำหรับเตรียม spore suspension

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (Becto® Potato Dextrose Agar, Difco Laboratory, U.S.A.) : เตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA จำนวน 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร อุ่นจนอาหารละลายหมด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 3.5 โดยเติมสารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10% จำนวน 19 มิลลิลิตร

- สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10% (tartaric acid, Carlo Erba Reagent, Germany) : เตรียมโดยชั่งกรดทาร์ทาริก จำนวน 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- สารอิมัลซิฟายเออร์ Tween20 (Tween® 20 solution 10%, Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 ขั้นตอนและวิธีการเตรียมเชื้อรา *Penicillium digitatum*

3.3.1 การเตรียมเชื้อรา *P. digitatum*

นำเชื้อรา *P. digitatum* จาก stock culture (stock culture ได้มาจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้ loop ลนไฟจนแดง รอให้เย็นลงสักครู่ แล้วนำไปแตะเส้นใยของเชื้อราบน stock culture จากนั้นนำ loop ที่มีเส้นใยของเชื้อราแตะไปตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อยู่ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะบริเวณเส้นใยสีขาวของเชื้อรา *P. digitatum* นำมาวางตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อยู่ เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดียว นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา *P. digitatum* บริสุทธิ์ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน สำหรับใช้ในการทดลอง

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมและการปลูกเชื้อ (Inoculation)

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา *P. digitatum* บริสุทธิ์ (pure culture) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน มาเตรียมสารละลายแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) โดยเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล หรือแท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมถูผิวของ culture เบาๆ ด้วยวิธี spread plate แล้วเทใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปตามปริมาตรที่ต้องการ หยด Tween20 ลงไปในบีกเกอร์ที่มีของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* ประมาณ 5 หยด แล้วใช้แท่งแก้วคนให้สารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* กระจายตัว จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกรองเอาเส้นใยออก จึงนำไปวัดความเข้มข้นของสปอร์ โดยหยดสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum* ลงบนแผ่น

แก้ว Haemacytometer แล้วนำไปนับจำนวณสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงคำนวณหาความเข้มข้นของ spore suspension ตามสูตร ดังนี้ (เกวลิน, 2547)

$$\text{ความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้}}{\text{จำนวนครั้งที่นับ}} \times 1 \times 10^4 \quad \text{สปอร์/มิลลิลิตร}$$

การปลูกเชื้อทำโดยนำเข็มจุ่มลงไปใน spore suspension ของเชื้อรา *P. digitatum* แล้วแทงเข็มลงไปบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร ด้านละ 1 แผล โดยบนผลส้มแต่ละผลปลูกเชื้อเป็นจำนวน 2 แผล หลังจากนั้นนำไปวางบนตะกร้า (ภาพ 3.1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปผ่านกรรมวิธีขั้นตอนต่อไป

3.4 วิธีการวิจัย

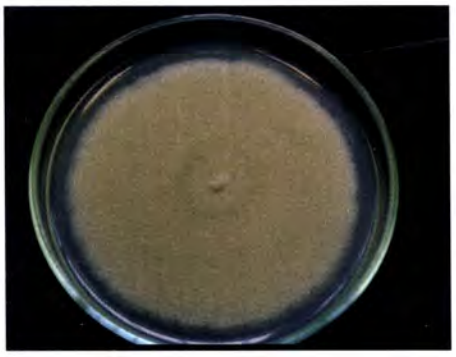
งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก กรดเพอร์ออกซีซิตริก โซเดียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมซอร์เบต และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ ที่สามารถลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3%

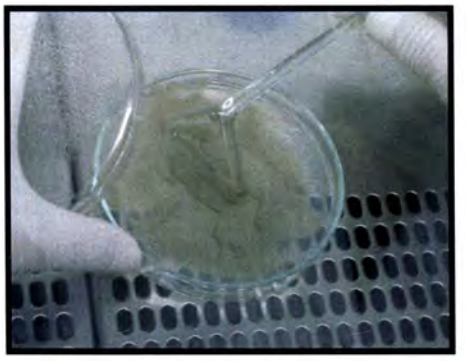
การทดลองที่ 2 ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการจุ่มผลส้มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก กรดเพอร์ออกซีซิตริก โซเดียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมซอร์เบต และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ ตามความเข้มข้นที่ได้ผลดี จากการทดลองที่ 1 โดยสามารถลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3%

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อการควบคุมโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3%

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% และที่อุณหภูมิ5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3%



(a) ลักษณะเชื้อ *P. digitatum*



(b) การ spread เชื้อบน plate

(c) การกรองเส้นใยของเชื้อรา *P. digitatum*

(d) การนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทัศน์

(e) สารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *P. digitatum*

(f) การปลูกเชื้อบนผลส้ม

(g) วางผลส้มลงในตะกร้าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส

ภาพ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายแขวนลอยของสปอร์และการปลูกเชื้อบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง

3.4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก กรดเพอร์-ออกซีซิตริก โซเดียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมซอร์เบต และโพแทสเซียมเมแทไบซัล-ไฟต์ ที่สามารถลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3%

3.4.1.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 24 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มจำนวน 10 ผล

3.4.1.2 วิธีการทดลอง

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บเกี่ยวช่วงต้นเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา คัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช บรรจุลงในตะกร้า ผึ่งให้ผิวนอกแห้ง หลังจากนั้นนำผลส้มไปปลูกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยสปอร์ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้เข็มจุ่มลงในสารละลายแขวนลอยสปอร์ แล้วแทงลงไปบนผลส้มลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร ด้านละ 1 แผล โดยบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแต่ละผลปลูกเชื้อเป็นจำนวน 2 แผล หลังจากนั้นนำผลส้มที่ผ่านการปลูกเชื้อไปวางในตะกร้าและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธี ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.01 และ 0.02% น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) (CFSAN/Office of Food Additive Safe, 2006) เตรียมโดยปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 20 และ 40 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 ลิตร จะได้สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.01 และ 0.02% w/v ตามลำดับ
- สารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริก ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05% w/v เตรียมโดยปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริก 5% จำนวน 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 ลิตร จะได้สารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริก ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05% w/v ตามลำดับ

- สารละลายโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05% w/v (กนกรัตน์และคณะ, 2542) เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมเมแทไบ-ซัลไฟต์จำนวน 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05% w/v ตามลำดับ
- สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% w/v (Smilanick *et al.*, 1999; Palou *et al.*, 2002) เตรียมโดยชั่งโซเดียมไบ-คาร์บอเนตจำนวน 100, 150, 200, 250 และ 300 กรัม ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 ลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% w/v ตามลำดับ
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% w/v (Montesinos-Herrero *et al.*, 2009) เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตจำนวน 100, 150, 200, 250 และ 300 กรัม ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% w/v ตามลำดับ

กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	ผลส้มที่ไม่ได้ผ่านการล้างและไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
กรรมวิธีที่ 2	ผลส้มที่จุ่มในน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 นาที (ชุดควบคุมที่ 2)
กรรมวิธีที่ 3-4	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติกความเข้มข้น 0.01 หรือ 0.02% w/v เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 5-9	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีซิตริกความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 หรือ 0.05% w/v เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ
กรรมวิธีที่ 10-14	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 หรือ 0.05% w/v เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ
กรรมวิธีที่ 15-19	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0% w/v เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 20-24 ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 หรือ 3.0% w/v เป็นเวลา 3 นาที ตามลำดับ

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ดังกล่าวมาผึ่งให้ผิวนอกแห้ง หลังจากนั้นวางผลส้มลงในถาดหลุมพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วบรรจุลงในกล่องกระดาษขนาดความกว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 29.1×41.4×9.0 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน โดยประเมินความเสียหายของผลส้มทุกวันจนผลส้มเน่าทั้งผล

3.4.1.3 การประเมิน

หลักการ โรคเน่าราสีเขียวเป็นโรคที่เกิดหลังการเก็บเกี่ยว มีสาเหตุจากเชื้อรา *P. digitatum* และการเข้าทำลายจะเกิดขึ้นกับผลที่มีแผลเท่านั้น อาการของโรคจะเริ่มที่ผิวของผลส้ม ทำให้เกิดเป็นจุดฉ่ำน้ำที่เปลือก แล้วแผลจึงขยายออกไปเป็นวงกว้าง เนื้อเยื่อนิ่มขึ้น จากนั้นเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวอยู่ที่ส่วนของเปลือก แล้วจึงสร้างกลุ่มสปอร์สีเขียวมะกอกขึ้นตรงกลางแผลในภายหลัง (ดนัย, 2549)

การประเมินความเสียหายของผลส้มจะพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ความรุนแรงของโรค และระดับการเกิดสปอร์

ก. การเกิดโรคเน่าราสีเขียว

วิธีการประเมินผล การประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของผลส้ม จะใช้จุดฉ่ำน้ำที่เปลือกเป็นเกณฑ์แสดงอาการของโรค ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามขนาดของจุดฉ่ำน้ำที่ขยายออก โดยแบ่งพื้นที่บนเปลือกผลส้มออกเป็น 5 ส่วน ตามแนวขั้วผลไปด้านล่างผล และจัดเป็นระดับการเกิดโรค (ภาพ 3.2) ดังนี้ (Inkha, 2009)

คะแนน 0	หมายถึง ผลปกติมีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	0	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 1	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	1-20	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 2	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	21-40	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 3	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	41-60	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 4	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	61-80	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 5	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว	81-100	เปอร์เซ็นต์

คะแนน 0 คะแนน 1 คะแนน 2

คะแนน 3 คะแนน 4 คะแนน 5

ภาพ 3.2 ระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว

การเกิดโรคแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของคะแนนการเกิดโรค}}{\text{จำนวนผลส้มที่เป็นโรค}} \times \frac{100}{\text{ระดับคะแนนสูงสุดที่เป็นโรค}}$$

ข. ความรุนแรงของโรค

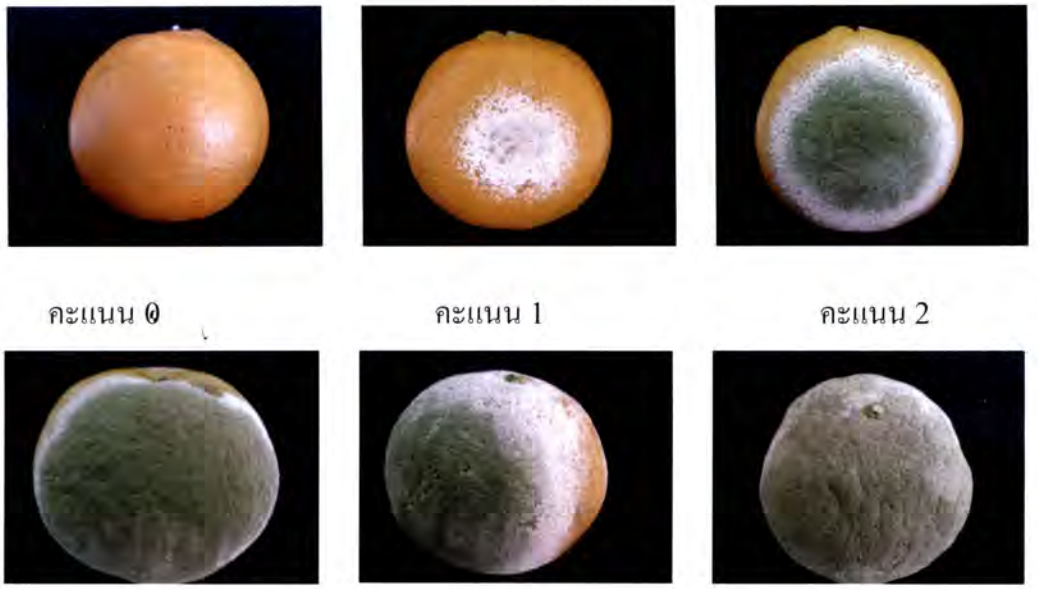
วิธีการประเมินผล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบาดแผล ตามด้านกว้างและด้านยาวของผลส้ม แล้วแสดงผลเป็นหน่วยเซนติเมตร

ค. การเกิดสปอร์

วิธีการประเมินผล การประเมินระดับการเกิดสปอร์ของผลส้ม ได้ประเมินตามขนาดของสปอร์สีเขียวมะกอกที่ขยายออก โดยแบ่งพื้นที่บนเปลือกผลส้มออกเป็น 5 ส่วน ตามแนวขั้วผลไปด้านล่างของผล และจัดเป็นระดับการเกิดสปอร์ (ภาพ 3.3) ดังนี้ (Inkha, 2009)

คะแนน 0	หมายถึง ผลปกติมีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว	0	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 1	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว	1-20	เปอร์เซ็นต์
คะแนน 2	หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว	21-40	เปอร์เซ็นต์

คะแนน 3 หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว 41-60 เปอร์เซ็นต์
คะแนน 4 หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว 61-80 เปอร์เซ็นต์
คะแนน 5 หมายถึง ผลส้มที่มีระดับการเกิดสปอร์สีเขียว 81-100 เปอร์เซ็นต์



คะแนน 0 คะแนน 1 คะแนน 2

คะแนน 3 คะแนน 4 คะแนน 5

ภาพ 3.3 ระดับการเกิดสปอร์สีเขียวบนเปลือกของผลส้ม

การเกิดสปอร์แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของคะแนนการเกิดสปอร์}}{\text{จำนวนผลส้มที่เกิดสปอร์}} \times \frac{100}{\text{ระดับคะแนนสูงสุดที่เกิดสปอร์}}$$

3.4.1.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16

3.4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสม ในการจุ่มผลส้มในสารละลายกรดเพอร์-ออกซีแอซีติก กรดเพอร์ออกซีซิตริก โซเดียมไบคาร์บอเนต โพแทสเซียมซอร์เบต และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ ตามความเข้มข้นที่ได้ผลดี จากการทดลองที่ 1 โดยสามารถลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3%

3.4.2.1 การวางแผนการทดลอง

นำผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งได้สารละลายที่ให้ผลดีในการลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเป็นลำดับที่ 1, 2 และ 3 คือ สารละลายโพแทสเซียมซอร์ไบตความเข้มข้น 1.5% สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.5% และสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 0.02% จึงนำมาทดสอบซ้ำอีกครั้งเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของสารละลายที่สามารถลดการเกิดโรคเน่าราสีเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งได้ดีที่สุด เปรียบเทียบกับผลส้มที่แช่ในน้ำกลั่นและผลส้มที่ไม่ได้แช่น้ำในน้ำกลั่น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 17 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มจำนวน10 ผล

3.4.2.2 วิธีการทดลอง

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บเกี่ยวช่วงปลายเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา คัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช บรรจุลงในตะกร้า ผึ่งให้ผิวนอกแห้ง จากนั้นนำผลส้มไปปลูกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยสปอร์ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้เข็มจุ่มลงในสายละลายแขวนลอยของสปอร์ แล้วแทงลงไปบนผลส้มลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร ด้านละ 1 แผล โดยบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแต่ละผลปลูกเชื้อเป็นจำนวน 2 แผล หลังจากนั้นนำผลส้มที่ผ่านการปลูกเชื้อไปวางในตะกร้า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธี ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%

- สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5%
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5%
- สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร หลังจากนั้นปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต แล้วค้นให้เข้ากัน จะได้ สารละลายผสมระหว่างโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบต จำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร หลังจากนั้นปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต แล้วค้นให้เข้ากัน จะได้ สารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%

กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	ผลส้มที่ไม่ได้ผ่านการล้างและไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
กรรมวิธีที่ 2	ผลส้มที่จุ่มในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที (ชุดควบคุมที่ 2)
กรรมวิธีที่ 3-5	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ตามลำดับ
กรรมวิธีที่ 6-8	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ตามลำดับ
กรรมวิธีที่ 9-11	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 12-14 ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ตามลำดับ

กรรมวิธีที่ 15-17 ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 1, 3 หรือ 5 นาที ตามลำดับ

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆดังกล่าวมาผึ่งให้ผิวนอกแห้ง หลังจากนั้นวางผลส้มลงในถาดหลุมพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วบรรจุลงในกล่องกระดาษขนาดความกว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 29.1×41.4×9.0 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% เป็นเวลา 5 วัน โดยประเมินความเสียหายของผลส้มทุกวันจนผลส้มเน่าทั้งผล

3.4.2.3 การประเมินความเสียหายของผลส้ม

ทำการประเมินความเสียหายของผลส้มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4.3 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อการควบคุมโรคเน่าราเขียวบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3%

3.4.3.1 การวางแผนการทดลอง

นำผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ให้ผลดีจากการทดลองที่ 2 ซึ่งได้สารฆ่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลดีที่สุด คือ สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% แช่ผลส้มที่ผ่านการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 นาที จึงนำมาทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยเปรียบเทียบกับผลส้มที่แช่ในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 5 นาที กับผลส้มชุดควบคุมเป็นผลส้มที่แช่ในน้ำกลั่น และผลส้มที่ไม่ได้แช่ในน้ำกลั่น

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มจำนวน10 ผล

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.4.3.2 วิธีการทดลอง

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บเกี่ยวช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา คัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช บรรจุลงในตะกร้า ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลส้มไปปลูกสปอร์ของเชื้อรา *P. digitatum* ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยสปอร์ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยใช้เข็มจุ่มลงในสารละลายแขวนลอยสปอร์แล้วแทงเข็มลงไปบนผลส้มลึกประมาณ 3 มิลลิเมตร ด้านละ 1 แผล โดยบนผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งแต่ละผลปลูกเชื้อเป็นจำนวน 2 แผล หลังจากนั้นนำผลส้มที่ผ่านการปลูกเชื้อไปวางบนตะกร้าบ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธี ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5%
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบต จำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร หลังจากนั้นปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต แล้วค้นให้เข้ากัน จะได้ สารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%

กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	ผลส้มที่ไม่ได้ผ่านการล้างและไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
กรรมวิธีที่ 2	ผลส้มที่จุ่มในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที (ชุดควบคุมที่ 2)
กรรมวิธีที่ 3	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 5 นาที

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆดังกล่าวมาผึ่งให้ผิวนอกแห้ง หลังจากนั้นวางผลส้มลงในถาดหลุมพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บรรจุถาดลงในกล่องกระดาษขนาดความกว้าง×ยาว×สูง เท่ากับ 29.1×41.4×9.0 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 วัน โดยประเมินความเสียหายของผลส้มทุก 5 วันจนผลส้มเน่าทั้งผล

3.4.3.3 การประเมินความเสียหายของผลส้ม

ทำการประเมินความเสียหายของผลส้มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

3.4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทีย์ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% และที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3%

3.4.4.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดสอบเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มจำนวน 3 ผล

3.4.4.2 วิธีการทดลอง

ก. ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทีย์ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3%

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บเกี่ยวช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2552 มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา คัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช บรรจุลงในตะกร้า ผึ่งให้ผิวนอกแห้ง จากนั้นนำผลส้มไปผ่านกรรมวิธี ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5%
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบต จำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร หลังจากนั้นปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต แล้วค้นให้เข้ากัน จะได้ สารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%

กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	ผลส้มที่ไม่ได้ผ่านการล้างและไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
กรรมวิธีที่ 2	ผลส้มที่จุ่มในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที (ชุดควบคุมที่ 2)
กรรมวิธีที่ 3	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 5 นาที

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3% แล้วสุ่มตัวอย่างผลส้มออกมาทุกๆ 5 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของเปลือก ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณวิตามินซี วัดค่าพีเอช และประเมินลักษณะปรากฏภายนอก จนผลส้มสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

การสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาของผลส้มพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลส้ม โดยผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเมื่อสูญเสียน้ำหนักประมาณ 7% ผลส้มจะปรากฏลักษณะภายนอกบริเวณขั้วและรอบๆ ผลเหี่ยว ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และถือว่าสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (วรวลัญช์, 2550)

ข. ศึกษาผลของสารฆ่าจุลินทรีย์ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งระหว่างเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3%

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งที่เก็บเกี่ยวช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 (เป็นผลส้มรุ่นสุดท้ายของส้มนอกฤดูจากสวนของเกษตรกรในอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่) มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา คัดเลือกผลที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช บรรจุลงในตะกร้า ผึ่งให้ผิวนอกแห้ง จากนั้นนำผลส้มไปผ่านกรรมวิธี ดังนี้

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบตจำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร จะได้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5%
- สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมซอร์เบต จำนวน 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 ลิตร หลังจากนั้นปิเปตต์สารละลายกรดเพอร์ออกซีแอซีติก 5% จำนวน 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต แล้วค้นให้เข้ากัน จะได้ สารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02%

กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	ผลส้มที่ไม่ผ่านการล้างและไม่จุ่มในน้ำกลั่น (ชุดควบคุมที่ 1)
กรรมวิธีที่ 2	ผลส้มที่จุ่มในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที (ชุดควบคุมที่ 2)
กรรมวิธีที่ 3	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4	ผลส้มที่จุ่มในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 1.5% ร่วมกับกรดเพอร์ออกซีแอซีติก ความเข้มข้น 0.02% เป็นเวลา 3 นาที

นำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3% แล้วสุ่มตัวอย่างผลส้มออกมาทุกๆ 5 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของเปลือก ปริมาณกรดทั้งหมดที่

ไทเทรตได้ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณวิตามินซี วัดค่าพีเอช และประเมินลักษณะปรากฏภายนอก จนผลส้มสิ้นสุดอายุการเก็บรักษา

การสิ้นสุดอายุการเก็บรักษาของผลส้มพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลส้ม โดยผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเมื่อสูญเสียน้ำหนักประมาณ 7% ผลส้มจะปรากฏลักษณะภายนอกบริเวณขั้วและรอบๆ ผลเหี่ยว ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และถือว่า สิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (วรวลัญช์, 2550)

3.4.4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

ก. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด

หลักการ การสูญเสียน้ำของผลส้มเกิดจากกระบวนการที่น้ำเคลื่อนที่จากผลส้มออกสู่อากาศภายนอก ซึ่งจะเกิดขึ้นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกที่ใช้เก็บรักษาผลส้ม ปัจจัยภายใน เช่น ขนาดของผลิตผล จำนวนปากใบ โครงสร้างของสารเคลือบผิว และบาดแผล เป็นต้น และปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ และการเคลื่อนไหวของอากาศ (จริงแท้, 2544)

วิธีการวิเคราะห์

วัดการสูญเสียน้ำหนักสดของผลส้มระหว่างการเก็บรักษา โดยชั่งน้ำหนักผลส้มเมื่อวันเริ่มต้นด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland) แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในห้องเก็บรักษา (ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3 เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นนำผลส้มออกมาทำการชั่งน้ำหนักซ้ำทุกๆ 5 วัน โดยใช้ผลส้มในแต่ละกรรมวิธีชุดเดิมจนครบ 26 วันที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3 เปอร์เซ็นต์ และ 36 วันที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95±3 เปอร์เซ็นต์ นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสด} = \frac{\text{น้ำหนักผลส้มเมื่อวันเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักผลส้ม ณ วันที่เก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักผลส้มวันเริ่มต้น}} \times 100$$

ข. สีของเปลือกผลส้ม

หลักการ เครื่องวัดค่าสีจะปล่อยแสงไปกระทบวัตถุ แสงเมื่อกระทบวัตถุแล้วจะสะท้อนกลับมายังเครื่องเพื่อประมวลผลค่าสีของวัตถุออกมาเป็นค่า L*, a* และ b* โดยมีรายละเอียด ดังนี้

L* = ค่าที่แสดงสีขาวและสีดำ

ค่า L* = 100 หมายถึง วัตถุมีสีขาว, ค่า L* = 0 หมายถึง วัตถุมีสีดำ

a* = ค่าที่วัดได้ตามแนวแกน X

ค่า a* เป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง, ค่า a* เป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

b* = ค่าที่วัดได้ตามแนวแกน Y

ค่า b* เป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง, ค่า b* เป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma (C*) เป็นค่าที่แสดงความเข้มของวัตถุ ค่า chroma มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีจาง (เทา), ค่า chroma มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

ค่า hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงสีที่แท้จริงของวัตถุในช่วงมุม 0-360 องศา แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีแดงถึงสีส้มแดง

45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง

90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว

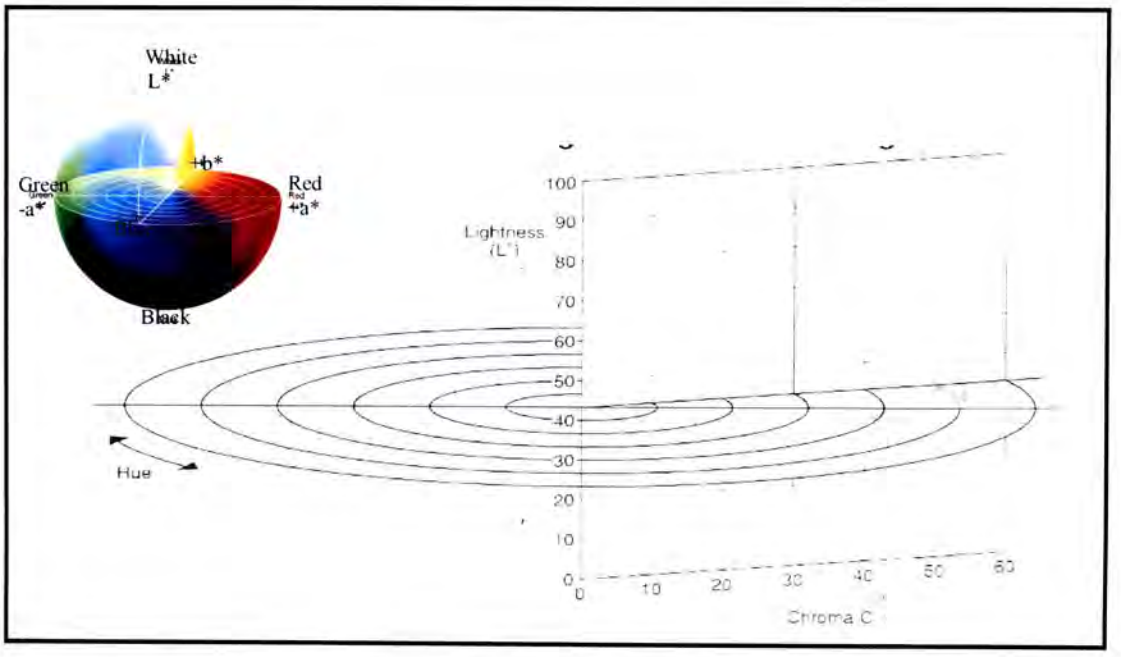
135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว

180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว

255-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน

270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงสีแดง (ภาพ 3.4)



ภาพ 3.4 ภาพแสดงค่า Chroma and lightness ของ color chart

ที่มา : Konica Minolta Sensing, Inc. (1998)

วิธีวิเคราะห์

ใช้เครื่องวัดสี (Colorimeter, Hunter Associates Laboratory, ColorQuest XE, USA.) ใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D65 หัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.375 นิ้ว วัดสีของเปลือกผลส้มบริเวณจุดกึ่งกลางของผล ผลละ 3 จุด บันทึกเป็นค่า L*, a*, b* ค่า chroma (C*) และ hue angle (h°)

3.4.4.4 การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี

ก. ปริมาณความชื้นของเปลือกผลส้ม

หลักการ น้ำที่มีอยู่ในเซลล์ของผักและผลไม้ส่วนมากอยู่ในรูปน้ำอิสระ (free water) มีน้ำส่วนเล็กน้อยที่เกาะรวมตัวกันในรูป chemical bonds (สายชล, 2528) น้ำที่อยู่ในรูปอิสระระเหยได้ง่าย ส่วนน้ำที่เกาะรวมตัวกันในรูป chemical bonds จะระเหยได้ยาก การหาความชื้นของผักและผลไม้ด้วยวิธี oven drying เป็นการหาน้ำหนักที่หายไป เนื่องจากการระเหยของน้ำอิสระที่อยู่ภายในเซลล์และสารที่ระเหยได้ทั้งหมด ณ อุณหภูมินั้น (Ranganna, 1986)

วิธีการวิเคราะห์

อบกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาในตู้อบ (hot air oven, MEMMERT, UM 500, Germany) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบปิดฝา ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) ชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Mettler Toledo, PB 3002-5, Switzerland) ชั่งน้ำหนักเปลือกผลส้ม 5 กรัม ใส่ลงในกระป๋องโลหะที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Singh and Reddy, 2006) หลังจากนั้นจึงนำออกจากตู้อบปิดฝาทันที ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักที่หายไปของเปลือกผลส้ม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น (wet basis)} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

ข. ค่าพีเอช

หลักการ การวัดค่าพีเอชเป็นการวัดค่าความเป็นกรด หรือความเป็นด่างของสารละลายใดๆ ซึ่งแปรผันตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนที่อยู่ในสารละลายนั้น (นิธิยา, 2549)

$pH = -\log [H^+]$ เมื่อ $[H^+]$ คือความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน

เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชจะลดลง

วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำส้มคั้นที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 3 ผลรวมกัน มาวัดหาค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH-meter, SCHOTT GERATE, Consort C 831, Belgium) โดยตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องพีเอชมิเตอร์ด้วยบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ค่าพีเอช 4 พีเอช 7 และพีเอช 10 ก่อนทำการวัด จากนั้นจุ่มอิเล็กโทรด (electrode) ลงในน้ำส้มคั้น รอจนกว่าค่าที่อ่านได้หยุดนิ่ง จึงบันทึกค่าพีเอชของน้ำส้มคั้น

ค. ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity; TA)

หลักการ ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ วิเคราะห์ได้โดยการไทเทรตน้ำส้มคั้นด้วยสารละลายด่างมาตรฐานจนถึงจุดยุติ (end point) ที่อินดิเคเตอร์เปลี่ยนสี หรือวัดค่าพีเอชได้ที่ 8.1 แสดงผลเป็นปริมาณของกรดอินทรีย์ชนิดที่มีมากที่สุดในผลส้ม คือกรดซิตริก

ชนิดของกรดอินทรีย์และค่าที่ใช้ในการคำนวณ

กรดมาลิก	0.067	กรัม
กรดออกซาลิก	0.045	กรัม
กรดซิตริก	0.070	กรัม
กรดทาร์ทาริก	0.075	กรัม
กรดแอซีติก	0.060	กรัม

(AOAC, 2005)

สารเคมีที่ใช้

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (sodium hydroxide, MERCK, Darmstsdt, Germany) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำส้มคั้นที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 3 ผลรวมกัน มาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ตามวิธีของ AOAC (2005) โดยชั่งน้ำส้มคั้นจำนวน 10 กรัม เติมน้ำกลั่นจำนวน 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วจึงไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายถึงจุดยุติมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.1 โดยใช้บิวเรตต์อัตโนมัติ และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH-meter, SCHOTT GERATE, Consort C 831, Belgium) บันทึกปริมาณของ

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้วคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำส้มคั้น) โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ดังนี้

1 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซิตริก 0.070 กรัม

$$\text{ปริมารกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (0.1 N)} \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้} \times 0.070 \times 100}{\text{น้ำหนักน้ำส้มคั้น(g)}}$$

ง. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS)

หลักการ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด หมายถึง ปริมาณของสารประกอบชนิดต่างๆ ที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ในตัวทำละลายที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ คือ น้ำและของแข็งที่ละลายน้ำได้มักจะเป็นน้ำตาลและกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้งกรดแอมิโนและกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

วิธีวิเคราะห์

นำน้ำส้มคั้นที่ได้จากการคั้นน้ำส้ม 3 ผลรวมกัน มาวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ด้วยเครื่องดิจิตอลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Digital refractometer, ATAGO, PAL-1, Japan) ที่อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-53 เปอร์เซ็นต์

จ. ปริมาณวิตามินซี

หลักการ วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกในน้ำผลไม้จะไปทำปฏิกิริยารีดักชันกับสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol เกิดเป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถึงจุดยุติที่เกินพอ (end point unreduced dye) จะเกิดเป็นสีชมพู สารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol มีสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง และมีสีแดงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (Ranganna, 1986)

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก (oxalic acid, Fisher Scientific, UK.) จำนวน 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร
- สารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2,6-dichlorophenol-indophenol (Ajax Finechem, Australia)

จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร จึงนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 (Whatman, International, England) เก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยชั่งกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (L-ascorbic acid, MERCK, Darmstadt, Germany) จำนวน 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดออกซาลิกให้ครบ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานมา 1 มิลลิลิตร เติมกรดออกซาลิก ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์จำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol จนถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณ กรดแอสคอร์บิกในน้ำส้มคั้น

วิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิกในน้ำส้มคั้น โดยใช้วิธีการไทเทรชัน ชั่งน้ำส้มคั้นที่ได้จากการคั้นผลส้ม 3 ผลรวมกัน จำนวน 10 กรัม แล้วเติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ปิเปตต์สารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติซึ่งจะได้สารละลายมีสีชมพูที่คงตัวเป็นเวลาประมาณ 15 วินาที แล้วคำนวณหากรดแอสคอร์บิก โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้กับสารตัวอย่างน้ำส้มคั้นเปรียบเทียบกับปริมาตรของสารละลาย 2,6-dichlorophenol-indophenol ที่ใช้กับสารละลายแอสคอร์บิกมาตรฐาน โดยคำนวณตามสูตร (Ranganna, 1986) ดังนี้

ปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 1 มิลลิกรัม (จาก standard)

ปริมาตร indophenol dye b มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกรดแอสคอร์บิกเท่ากับ (1×b)/a มิลลิกรัม (จากสารละลายตัวอย่าง) เท่ากับ c มิลลิกรัม

สารละลายน้ำส้มคั้นเจือจาง 10 มิลลิลิตร มีปริมาณ กรดแอสคอร์บิก เท่ากับ c มิลลิกรัม

สารละลายน้ำส้มคั้นเจือจาง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณ กรดแอสคอร์บิกเท่ากับ(c×100)/10 มิลลิกรัม

เท่ากับ d มิลลิกรัม

น้ำส้มคั้น 10 กรัม มีปริมาณ กรดแอสคอร์บิก เท่ากับ d มิลลิกรัม

น้ำส้มคั้น 100 กรัม มีปริมาณ กรดแอสคอร์บิก เท่ากับ (d×100)/10 มิลลิกรัม

เท่ากับ e มิลลิกรัม/100 กรัม น้ำส้มคั้น

3.4.4.5 การประเมินอายุการเก็บรักษา

ก. อายุการเก็บรักษา

อายุการเก็บรักษาของผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งจะพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลส้ม โดยผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งเมื่อสูญเสียน้ำหนักประมาณ 7% ผลส้มจะปรากฏลักษณะภายนอกบริเวณขั้วและรอบๆ ผลเหี่ยว ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และถือว่า สิ้นสุดอายุการเก็บรักษา (วรวลัญช์, 2550)

3.4.4.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และใช้การทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.16