

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

มะม่วงโชคอนันต์

3.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่ใช้ในการทดลองทำการเก็บเกี่ยวมะม่วงที่มีความสุกแก่ระยะร้อยละ 80 จากอำเภอด่านมะขามเตี้ย จังหวัดกาญจนบุรี หลังจากการเก็บเกี่ยวทำการบรรจุในตะกร้าพลาสติกที่บุด้วยฉนวนกันความร้อนแล้วขนส่งโดยรถตู้มายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยรถตู้ปรับอากาศ หลังจากนั้นนำผลมะม่วงมาตัดแต่งล้างทำความสะอาดและทำการคัดผลมะม่วงที่ไม่มีตำหนิจากโรค หนอนหรือแมลง ไม่มีบาดแผลและมีขนาดใกล้เคียงกัน แล้วนำมาทำการทดลองดังนี้

3.2 วิธีการทดลอง

หลังจากการคัดเลือกและการตัดแต่งข้อผลแบ่งมะม่วงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ทำการจัดเรียงมะม่วงที่ได้ตามทรีทเมนต์ในหัวข้อ 3.2.1 มะม่วงที่นำไปทำการฉายรังสีที่ระดับปริมาณรังสีต่าง ๆ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ซึ่งให้แต่ละทรีทเมนต์ประกอบด้วย 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำประกอบไปด้วยมะม่วง 1 ผล หลังจากการฉายรังสีนำมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 และ 13 องศาเซลเซียส ทำการตรวจวัดคุณภาพและการเปลี่ยนแปลงทุก 2 วัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและคุณภาพในการรับประทานของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ทรีทเมนต์ 1	ไม่ผ่านการใช้รังสี
ทรีทเมนต์ 2	ไม่ผ่านการใช้รังสีแต่จุ่มด้วยสาร benomyl ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร
ทรีทเมนต์ 3	ฉายรังสีแกมมา ความเข้มข้นรังสี 0.3 กิโลเกรย์
ทรีทเมนต์ 4	ฉายรังสีแกมมา ความเข้มข้นรังสี 0.6 กิโลเกรย์
ทรีทเมนต์ 5	ฉายรังสีแกมมา ความเข้มข้นรังสี 1.0 กิโลเกรย์

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเคมีและคุณภาพในการรับประทานของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

ทรีตเมนต์ 1	ไม่ผ่านการใช้รังสี
ทรีตเมนต์ 2	ฉายรังสีแกมมา ความเข้มข้นรังสี 0.3 กิโลเกรย์
ทรีตเมนต์ 3	ไม่ผ่านการใช้รังสีแต่เคลือบด้วยไคโตซาน
ทรีตเมนต์ 4	เคลือบด้วยไคโตซานร่วมกับฉายรังสีแกมมา ความเข้มข้นรังสี 0.3 กิโลเกรย์
ทรีตเมนต์ 5	ไม่ผ่านการใช้รังสีแต่จุ่มด้วยสาร benomyl ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร

3.3 การบันทึกผลการทดลอง

3.3.1 การสูญเสียน้ำหนัก

เลือกผลมะม่วง เพื่อใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการ เก็บรักษา หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผลทุก 2 วัน นำค่าที่บันทึกได้ตลอดการทดลองมาคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{[\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}]}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อ

โดยการวัดสีผิวผล บริเวณ กลางผลทั้ง 2 ด้าน นำผลมะม่วงมาวัดสีเปลือกและเนื้อ โดยใช้เครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-301 รายงานผลเป็นค่า L a และ b

- ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี โดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูง หมายถึงมีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมาก
- ค่า a เป็นบวกเป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนีสีแดง
- ค่า b เป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนีสีเหลือง

3.3.3 การเกิดโรคโดยการให้คะแนน (Zhang และ Quantick, 1997)

การเกิดโรค ดูการเข้าทำลายผลิตผลโดยเชื้อสาเหตุในธรรมชาติแล้วคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ตรวจสอบการเกิดโรคของผลมะม่วงโดยการให้คะแนน ดังนี้

- 0 = ไม่มีการเกิดโรค
- 1 = มีอาการเกิดโรคเป็นจุดเล็ก ๆ
- 2 = มีอาการเกิดโรคน้อยกว่าร้อยละ 25 ของพื้นที่ผิว

3 = มีอาการเกิดโรคร้อยละ 25 – 50 ของพื้นที่ผิว

4 = มีอาการเกิดโรค มากกว่าร้อยละ 50

3.3.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (S-soluble solids content)

โดยการนำน้ำคั้นจากเนื้อมะม่วงมาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solids content) โดยการ ใช้ hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น N1 ค่าที่ได้อ่านเป็นองศาบริกซ์ (°Brix)

3.3.5 เปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity) (A.O.A.C, 1984)

การหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ใช้วิธีการของ AOAC (1984) โดยนำน้ำคั้นจากส่วนเนื้อของผลมะม่วง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (N) โดยใช้ phenolphthalein ความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 1 – 2 หยดเป็น indicator จนถึงจุดยุติ (เมื่อสารละลายมี สีชมพูอย่างน้อย 30 วินาที) คำนวณปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดซิตริก โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

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

โดย	ml NaOH	=	ปริมาณสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
	N NaOH	=	ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH (นอร์มัล)
	meq. wt of citric acid	=	น้ำหนักโมเลกุลของกรดซิตริก (0.064)

3.3.5 ความแน่นเนื้อของผล

การเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อของผลมะม่วงโดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ texture analyzer TA-XT2 โดยวัดจากบริเวณกลางผลทั้ง 2 ข้างของผลมะม่วง ใช้หัวกด P/6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร กดลึกกลงไปในเนื้อมะม่วง 5 มิลลิเมตร ด้วยความเร็วในการกด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะห่างระหว่างหัวกดกับแท่นรองผลมะม่วงเท่ากับ 50 มิลลิเมตร ค่าความแน่นเนื้อที่ได้บันทึกผลเป็นหน่วยเป็นนิวตัน (Newton)

3.3.6 ลักษณะอาการผิดปกติต่าง ๆ โดยการให้คะแนนตัดสินแปลงมาจาก Zhang และ Quantick, (1997)

ลักษณะอาการผิดปกติต่าง ๆ ของผลิตผลแล้วคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ลักษณะอาการผิดปกติ ตรวจสอบลักษณะอาการผิดปกติของผลมะม่วงโดยการให้คะแนน ดังนี้

0 = ไม่มีลักษณะอาการผิดปกติ

- 1 = มีอาการลักษณะอาการผิดปกติเป็นจุดเล็ก ๆ
- 2 = มีอาการลักษณะอาการผิดปกติน้อยกว่าร้อยละ 25 ของพื้นที่ผิว
- 3 = มีอาการลักษณะอาการผิดปกติร้อยละ 25 – 50 ของพื้นที่ผิว
- 4 = มีอาการลักษณะอาการผิดปกติมากกว่าร้อยละ 50

กล้วยไข่

3.4 การเตรียมวัสดุทดลอง

กล้วยไข่ที่ใช้ในการทดลองทำการเก็บเกี่ยวมาจากอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ทำการบรรจุในตะกร้าพลาสติกที่บุด้วยชั้นกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วขนส่งโดยรถตู้ปรับอากาศมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขต บางขุนเทียน

3.5 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ในแต่ละสิ่งการทดลองประกอบด้วย 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำประกอบไปด้วยกล้วยไข่ 1 หวี โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของกล้วยไข่
ทำการบรรจุกล้วยไข่จำนวน 4 หวี ลงในกล่องกระดาษลูกฟูก นำไปฉายรังสีที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ บางเขน กรุงเทพฯ โดยมีสิ่งทดลองดังนี้

- | | |
|-------------|---|
| ทรีตเมนต์ 1 | ไม่ผ่านการฉายรังสีแกมมา |
| ทรีตเมนต์ 2 | ไม่ผ่านการฉายรังสีแต่จุ่มด้วยสารเบนโนมิล เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| ทรีตเมนต์ 3 | ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณความเข้มรังสี 0.3 กิโลเกรย์ |
| ทรีตเมนต์ 4 | ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณความเข้มรังสี 0.6 กิโลเกรย์ |
| ทรีตเมนต์ 5 | ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณความเข้มรังสี 1.0 กิโลเกรย์ |

หลังการฉายรังสีนำกล้วยไข่ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 และทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ผล ทุก 2 วัน ดังนี้

3.6 การบันทึกผลการทดลอง

3.6.1. การสูญเสียน้ำหนัก

คัดเลือกกล้วยไข่ เพื่อใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการเก็บรักษา หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผลทุก 2 วัน นำค่าที่บันทึกได้ตลอดการทดลองมาคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{[\text{น้ำหนักเริ่มต้น}-\text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}]}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3.6.2. การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกและสีเนื้อ

นำกล้วยไข่มาวัดสีเปลือกเพียงด้านเดียวและเนื้อบริเวณส่วนตรงกลางของผลที่ตัดแบ่งครึ่ง โดยใช้เครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-301 รายงานผลเป็นค่า L a และ b

- ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี โดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูง หมายถึง มีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมาก
- ค่า a เป็นบวกเป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนสีแดง
- ค่า b เป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนสีเหลือง

3.6.3. การเกิดโรคโดยการให้คะแนน (Zhang และ Quantick, 1997)

การเกิดโรค ดูการเข้าทำลายผลิตผลโดยเชื้อสาเหตุในธรรมชาติ ตรวจสอบการเกิดโรคของกล้วยไข่ โดยการให้คะแนน ดังนี้

- 0 = ไม่มีการเกิดโรค
- 1 = มีอาการเกิดโรคเป็นจุดเล็ก ๆ
- 2 = มีอาการเกิดโรคน้อยกว่าร้อยละ 25 ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
- 3 = มีอาการเกิดโรคร้อยละ 25 – 50 ของพื้นที่ผิวทั้งหมด
- 4 = มีอาการเกิดโรค มากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

3.6.4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solids content)

โดยการนำน้ำคั้นจากเนื้อกล้วยไข่มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solids content)

โดยใช้ hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น PAL -1 ค่าที่ได้อ่านเป็นองศาบริกซ์ (°Brix)

3.6.5. การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity) (A.O.A.C, 1984)

โดยการนำน้ำคั้นจากส่วนเนื้อกล้วยไข่จำนวน 5 มิลลิลิตร มาทำการไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้สารละลาย Phenolphthalein ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 1 – 2 หยด เป็น indicator ทำการไตเตรตจนถึงจุด end point คือเมื่อสารละลายมีสีชมพูอย่างน้อย 30 วินาที คำนวนกรดที่ไตเตรตได้ในรูปของกรดซิตริก ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อกล้วยไข่ ดังสมการ

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

(TA)

$$\text{Milliequivalent weight (meq.wt.) citric acid} = 0.064$$

3.6.6. ความแน่นเนื้อของผล

การเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อของกล้วยไข่โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ texture analyzer TA-XT2 โดยวัดจากบริเวณกลางผล ใช้หัวกด P/6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร กดลึกลงไป ในเนื้อกล้วยไข่ 5 มิลลิเมตร ด้วยความเร็วในการกด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ตั้งระยะห่างระหว่างหัวกดกับแท่นรองกล้วยไข่เท่ากับ 50 มิลลิเมตร ค่าความแน่นเนื้อที่ได้บันทึกผลเป็นหน่วยเป็นนิวตัน (Newton)

3.6.7. การวัดอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

นำผลกล้วยไข่โดยใส่ในภาชนะปิดสนิทแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นสูบลมตัวอย่างก๊าซภายในกล่องด้วยกระบอกฉีดยาที่เป็นสูญญากาศปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC 8A สำหรับวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งใช้ column ชนิด porapak Q (Mesh 80/100) และรุ่น GC 14B การวิเคราะห์ก๊าซเอทิลีน ใช้ column ชนิด porapak Q (Mesh 80/100) โดยใช้สภาพของการวัดดังนี้

	CO ₂	C ₂ H ₄
4.1.1.Column	Porapak Q (Mesh 80/100)	Porapak Q (Mesh 80/100)
Column temperature	50°C	80°C
Inject temperature	120°C	120°C
Detector	TCD ¹	FID ²
Carrier gas	He	N ₂

¹TCD = Thermal Conductivity Detector

²FID = Flame Ionization Detector

วิธีการคำนวณ

อัตราการหายใจ (ml CO₂/kg.h)

$$= \frac{10 \times \text{พื้นที่ว่างของกล่องบรรจุ (ลิตร)} \times (\% \text{ CO}_2 \text{ ที่วัดได้} - 0.03)}{\text{น้ำหนักผลิตผล (กิโลกรัม)} \times \text{เวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)}}$$

อัตราการผลิตเอทิลีน (μl/kg.h)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนที่วัดได้ (ppm)} \times \text{พื้นที่ว่างของกล่องบรรจุ (ลิตร)}}{\text{น้ำหนักผลิตผล (กิโลกรัม)} \times \text{เวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)}}$$

3.6.8. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

3.6.8.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อส่วนผลกล้วยไข่ จำนวน 10 กรัม บดกับ น้ำ Deionized ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ให้ละเอียด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 g นาน 20 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเบอร์ 4 จากนั้นนำไปกรองด้วยเยื่อกรองขนาด 0.45 μm ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.6.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยเครื่อง HPLC

วิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC ของ Shimadzu ประกอบด้วย Quaternary pump (LC-10AD) ท่อก๊าซฮีเลียม (He) สำหรับไล่อากาศใน Mobile phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด Asahipak NH2P-50 4E ขนาด 4.6×250 มิลลิเมตร ทำการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้มือ (Manual injection) ตรวจวัดสารตัวอย่างโดย Refractive index detector (RID-6A, Shimadzu) และบันทึกผลโดยเครื่องโครมาโตแกรม C-R6A Chromatopac ของ Shimadzu

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	Asahipak NH2P-50 4E
Mobile phase	Acetone nitire 75 %
Injection volume	20 ไมโครลิตร
Flow rate	1 มิลลิลิตรต่อนาที
Column temperature	30 องศาเซลเซียส
Calibration	External standard calibration

3.6.9. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC Oxidase (ดัดแปลงจาก Kato และคณะ, 2002)

นำเนื้อกล้วยไข่หั่นละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน vial ขนาด 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง A และ B โดยชุดทดลอง A เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และชุดทดลอง B เติมด้วย reaction buffer (Tris - HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ACC ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (v/v) glycerol ร้อยละ 10 (v/v) DTT ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

ascorbate ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ FeSO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ NaHCO_3 ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปวัดปริมาณการผลิตก๊าซเอทิลีน โดยมีสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการตรวจวัดก๊าซเอทิลีน (ชุดควบคุมจะไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำกลั่นเป็นสื่อ)

$$\text{ACC oxidase activity} = \text{nl ethylene} / \text{g . h of tissue incubate in reaction buffer}$$

3.6.10. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Polygalacturonase (PG) และ Pectinmethylesterase (PME) (Luchsinger และ Corndk, 1962)

การสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างเนื้อกล้วยไข่ 10 กรัม เติม phosphate buffer ความเข้มข้น 100 mmol l^{-1} (pH 6.2) ที่ประกอบด้วย EDTA ความเข้มข้น 1 mol l^{-1} insoluble polyvinylpyrrolidone ความเข้มข้นร้อยละ 5 วิตามินซี ความเข้มข้น 100 mol l^{-1} จำนวน 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียด จากนั้นกรองด้วย Miracloth และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 g นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้นำไปวัด กิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PG

ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ polygalacturonic acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม sodium acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 4.5) จำนวน 2 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 3,5 -dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PME

ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับ pectin ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม bromthymol ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของรังสีแกมมาพร้อมกับการเคลือบไคโตซานต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของกล้วยไข่

ทำการคัดเลือกกล้วยไข่ในระยะเดียวกันกับการทดลองที่ 3 แล้วบรรจุลงในตะกร้าพลาสติกเช่นเดียวกัน เพื่อนำไปฉายรังสีแกมมา โดยจัดตั้งทดลองดังนี้

- ทรีตเมนต์ 1 ไม่ผ่านการฉายรังสี
- ทรีตเมนต์ 2 สารเคลือบไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1
- ทรีตเมนต์ 3 ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณความเข้มรังสี 0.3 กิโลเกรย์
- ทรีตเมนต์ 4 ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณความเข้มรังสี 0.3 กิโลเกรย์ร่วมกับการเคลือบไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1

หลังจากฉายรังสีแล้วนำผลผลิตไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 แล้วทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3

ทูลเรียน

3.7 การเตรียมวัสดุทดลอง

ทูลเรียนพันธุ์หมอนทอง (ความสุกแก่ระยะ 80 %) ที่ใช้ในการทดลองทำการเก็บเกี่ยวมาจากอำเภอ สวี จังหวัดชุมพร ขนส่งโดยรถตู้ปรับอากาศมายังห้องปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน หลังจากนั้นนำผลทูลเรียนมาบรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 40x42x20 เซนติเมตร 4 ผลต่อกล่องซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 10 กิโลกรัม แล้วนำไปฉายรังสีที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ บางเขน กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเคมีและกระบวนการสุกของผลทูลเรียน

วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ในแต่ละทรีตเมนต์ประกอบด้วย 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำประกอบไปด้วยทูลเรียน 1 ผล โดยแบ่งการทดลองออกเป็นดังนี้

- ทรีตเมนต์ 1 ไม่ผ่านการใช้รังสี
- ทรีตเมนต์ 2 ไม่ผ่านการใช้รังสีแต่ชุบด้วยสาร Benomyl 500 mg/L

- ทรีตเมนต์ 3 ฉายรังสีแกมมา ที่ความเข้มข้นรังสี 300 เกรย์
 ทรีตเมนต์ 4 ฉายรังสีแกมมา ที่ความเข้มข้นรังสี 600 เกรย์
 ทรีตเมนต์ 5 ฉายรังสีแกมมา ที่ความเข้มข้นรังสี 1000 เกรย์

หลังจากฉายรังสีแกมมานำทุเรียนกลับมาเก็บรักษาที่สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่อุณหภูมิต่ำ 20 องศาเซลเซียสและบันทึกผลการทดลองทุกวันดังนี้

3.8 การบันทึกผลการทดลอง

3.8.1. การสูญเสียน้ำหนัก

เลือกผลทุเรียน เพื่อใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการเก็บรักษา หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผลทุกวัน นำค่าที่บันทึกได้ตลอดการทดลองมาคำนวณดังนี้

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{[\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}]}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

3.8.2. ลักษณะปรากฏ

โดยการวัดสีเนื้อทุเรียนบริเวณกลางพู โดยใช้เครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-301 รายงานผลค่าเป็น L a และ b

- ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี โดยจะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูง หมายถึง มีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มมาก
- ค่า a เป็นบวกเป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนสีแดง
- ค่า b ที่มีค่าบวกเป็นค่าที่แสดงออกถึงโทนสีเหลือง

3.8.3. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (SSC)

ปั่นเนื้อทุเรียนในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (dilution factor) ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10

นาที่ นำส่วนใสมหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ด้วย hand refractometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น PAL-1 ค่าที่ได้อ่านในหน่วยของศาบริกซ์ (°Brix)

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ = ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ $\times$ 4 (dilution factor)

3.8.4. ความแน่นเนื้อของผล

การเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อของเนื้อทุเรียนโดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ texture analyzer รุ่น TA-XT2 โดยวัดจากบริเวณกลางพูทั้ง 2 ข้างของเนื้อทุเรียน ใช้หัวกด P/6 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร กดลึกลงไปในเนื้อทุเรียน 5 มิลลิเมตร ด้วยความเร็วในการกด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะห่างระหว่างหัวกดกับแท่นรองเนื้อทุเรียนเท่ากับ 50 มิลลิเมตร ค่าความแน่นเนื้อที่ได้บันทึกผลเป็นหน่วยเป็นนิวตัน (Newton)

3.8.5. การวัดอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

เจาะเปลือกทุเรียนด้วย Cock borer แล้วปิดด้วย septum เก็บตัวอย่างก๊าซภายในผลด้วยกระบอกฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatograph ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC 8A สำหรับวิเคราะห์ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ column ชนิด porapak Q (Mesh 80/100) และวิเคราะห์ก๊าซเอทิลีน ด้วย column ชนิด porapak Q (Mesh 60/80) โดยใช้สภาพของการวัดดังนี้

	CO ₂	C ₂ H ₄
4.1.1.Column	Porapak Q (Mesh 80/100)	Porapak Q (Mesh 60/80)
Column temperature	50°C	80°C
Inject temperature	120°C	120°C
Detector	TCD ¹	FID ²
Carrier gas	He	N ₂

¹TCD = Thermal Conductivity Detector

²FID = Flame Ionization Detector

3.8.6. ปริมาณน้ำตาล

นำเนื้อทุเรียนจำนวน 20 กรัม บดกับ เอทานอล 80% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ให้ละเอียด นำไปกรองด้วย กระดาษกรองเบอร์ 1 และนำส่วนใสที่กรองได้ทำการกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 μm ชนิด NYLON (National Scientific) ก่อนฉีดเข้าไปใน HPLC

การวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

วิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC ของ Shimadzu ประกอบด้วย Quaternary pump (LC-10AD) ท่อก๊าซ ฮีเลียม (He) สำหรับไล่อากาศใน Mobile phase โดยใช้คอลัมน์ชนิด Sugar Pak I column ขนาด 6.5×300 มิลลิเมตร โดยมี All-guard™ Guard cartridge เป็น Guard column นิดสารละลายตัวอย่าง เข้าสู่คอลัมน์โดยเครื่องฉีดตัวอย่างโดยใช้มือ (Manual injection) ตรวจวัดสารตัวอย่างโดย Refractive index detector (RID-6A) ของ Shimadzu และบันทึกผลโดยเครื่องโครมาโตแกรม C-R6A Chromatopac (Shimadzu)

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	Sugar Pak I column All-guard™ Guard cartridge holder
Mobile phase	acetonitrile : water (80:20)
Injection volume	20 ไมโครลิตรต่อนาที
Flow rate	0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
Column temperature	30 องศาเซลเซียส
Calibration	External standard calibration

3.8.9. กิจกรรมเอนไซม์ Polygalacturonase (PG) (Luchsinger และ Corndk, 1962)

การสกัดตัวอย่าง

นำเนื้อทุเรียน 10 กรัม เติม 100 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer (pH 6.2) (ประกอบด้วย 1 mol l⁻¹ EDTA 5%, insoluble polyvinylpolypyrrolidone, 100 mol l⁻¹ Vitamin C) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้

ละเอียด จากนั้นกรองด้วย Miracloth และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้นำไปวัด กิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PG

ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) 1 มิลลิลิตร ผสมกับ polygalacturonic acid ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 1 มิลลิลิตร 0.1 โมลาร์ sodium acetate buffer (pH 4.5) 2 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 3,5 -dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรและนำไปคำนวณกับกราฟมาตรฐานของ D-galacturonic acid

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PME

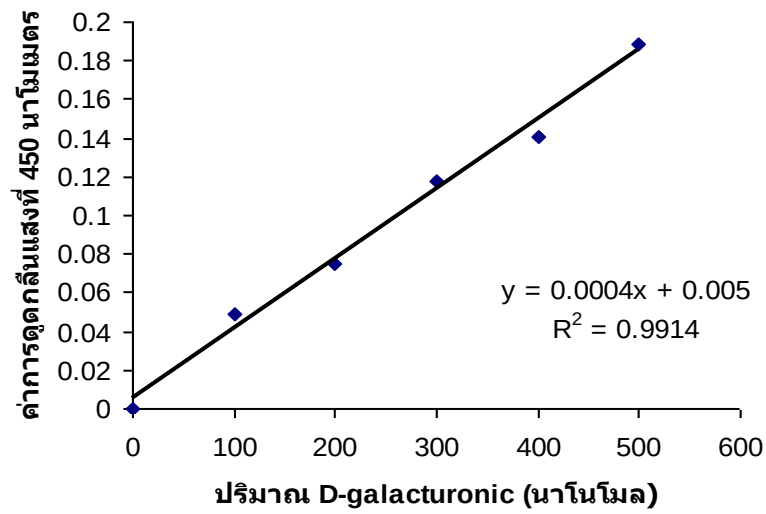
ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5% pectin 2 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.01% bromthymol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรและนำไปคำนวณกับกราฟมาตรฐานของกรดแอซิก

การเตรียมตัวอย่างมาตรฐาน D – galacturonic acid

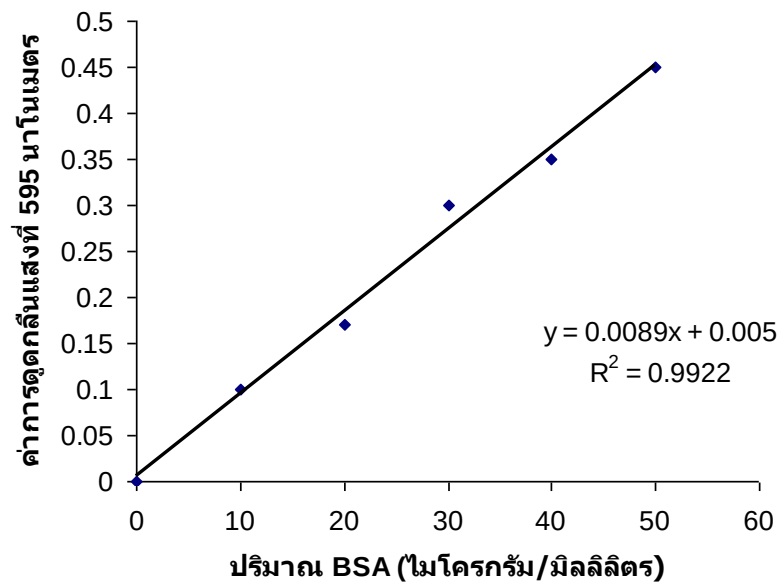
ชั่งสาร D – galacturonic acid จำนวน 5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย sodium acetate buffer (pH 4.5) 50 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลาย D – galacturonic acid ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเตรียมสารละลาย D – galacturonic acid ที่ระดับความเข้มข้น 0 100 200 300 400 และ 500 นาโนโมล แล้วทำให้เกิดสีโดยการเติม 3,5 - dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

การเตรียม 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

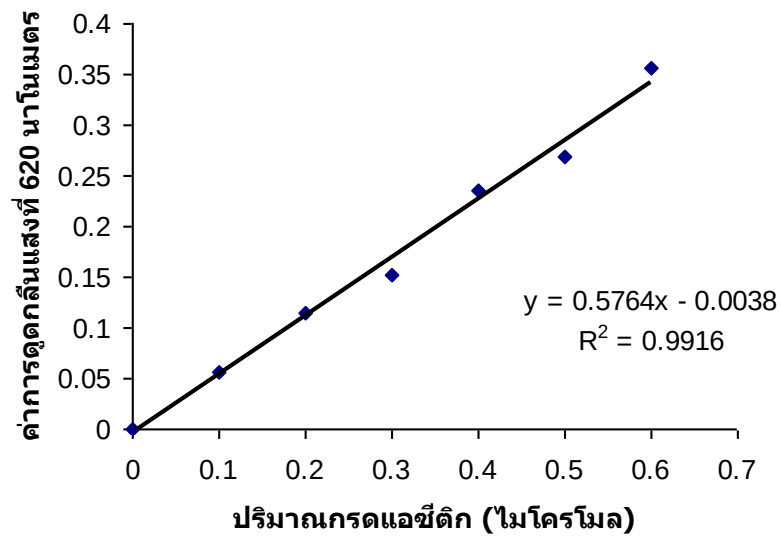
ชั่งสาร Dinitrosalicylic acid 2.5 กรัม ละลายใน NaOH ความเข้มข้น 2 N จำนวน 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม sodium potassium tartrate จำนวน 75 กรัม คนจนสารละลายหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง



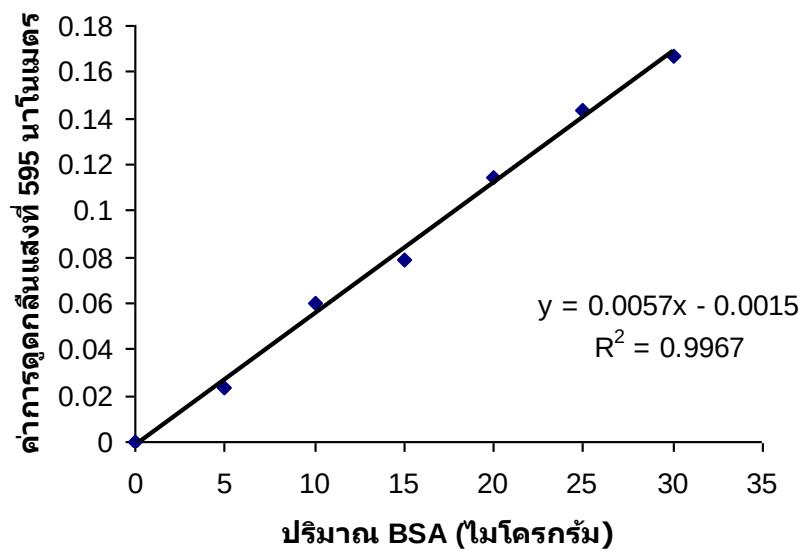
รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของกรด D – galacturonic สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase (PG)



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ polygalacturonase (PG)



รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานของกรดแอสซิดิก ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ pectin methylesterase (PME)



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ pectin methylesterase (PME)

3.8.10. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC Oxidase (ดัดแปลงจาก Kato และคณะ, 2002)

นำเนื้อทุเรียนหั่นละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน vial ขนาด 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง A และ B โดยชุดทดลอง A เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และชุดทดลอง B เติมด้วย reaction buffer (Tris - HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ACC ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (v/v) glycerol ร้อยละ 10 (v/v) DTT ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ascorbate ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ FeSO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ NaHCO_3 ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปวัดปริมาณการผลิตก๊าซเอทิลีน โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการวัดก๊าซเอทิลีน

$$\text{ACC oxidase activity} = \text{nl ethylene} / \text{g} \cdot \text{h of tissue incubate in reaction buffer}$$

3.8.11. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PG และ PME (Luchsinger and Corndk, 1962)

การสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างกล้วยไข่ 10 กรัม เติม 100 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 6.2) ประกอบด้วย 1 mol l⁻¹ EDTA 5% insoluble polyvinylpyrrolidone 100 mol l⁻¹ Vitamin C ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียด จากนั้นกรองด้วย Miracloth และนำไป centrifuged ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 x g นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้นำไปวัด กิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PG

ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 5% polygalacturonic acid 1 มิลลิลิตร 0.1 โมลาร์ sodium acetate buffer (pH 4.5) 2 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 3-,5 -dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปป้อนที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ PME

ปิเปตตัวอย่างที่สกัดได้ (supernatant) 0.3 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5% pectin 2 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีโดยการเติม 0.01% bromthymol 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน D – galacturonic acid

ชั่งสาร D – galacturonic acid 5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย sodium acetate buffer (pH4.5) 50 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลาย D – galacturonic acid ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเตรียมสารละลาย D – galacturonic acid ที่ระดับความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แล้วทำให้เกิดสีโดยการเติม 3,5 – dinitrosalicylic acid 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm

การเตรียม Dinitrosalicylic acid (DNS)

DNS solution เตรียมโดย ละลายสาร Dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม sodium potassium tartrate 75 กรัม และคนจนละลายหมดเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง

3.8.12. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ACC Oxidase (ดัดแปลงจาก Kato และคณะ, 2002)

นำเนื้อมะม่วงหั่นละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ลงใน vial ขนาด 10 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง A และ B โดยชุดทดลอง A เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และชุดทดลอง B เติมด้วย reaction buffer (Tris - HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ACC ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (v/v) glycerol ร้อยละ 10 (v/v) DTT ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ascorbate ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ FeSO₄ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ NaHCO₃ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปวัดปริมาณการผลิตก๊าซเอทิลีน โดยมี condition เช่นเดียวกับการวัดก๊าซเอทิลีน

ACC oxidase activity = nl ethylene / g . h of tissue incubate in reaction buffer