บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

บร็อคโคลีพันธุ์ท๊อปกรีน จากจังหวัดนครปฐมเก็บเกี่ยวแล้วขนส่งมายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) หลังจากนั้นคัดเลือกขนาดและวัยที่ใกล้เคียงกัน เพื่อใช้ดำเนินการทดลองต่อไป

3.2 วิธีการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> เพื่อศึกษาการเสื่อมสภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของบรอคโคลี่ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) นำบรอคโคลี่ที่เตรียมได้จากข้างต้น มาบรรจุในตะกร้าแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท แบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท 0 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท 12 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท 24 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 4 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท 48 ชั่วโมง
ชุดการทดลองที่ 5 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิท 72 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ดังนี้

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาผลของความร้อนต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม(PCD)

นำบร็อคโคลี่ที่เตรียมได้จากข้างต้น นำมาให้ความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที และที่ไม่ได้รับความร้อน (ชุดควบคุม) หลังจากนั้นนำมาเก็บ ที่อุณหภูมิต่างกันและระยะเวลาต่างกัน แบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที เก็บรักษาที่ 20 ˚C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 2 ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที เก็บรักษาที่ 10 ˚C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 3 ชุดที่ได้รับความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที เก็บรักษาที่ 20 ˚C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 4 ชุดที่ได้รับความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที เก็บรักษาที่ 10 ˚C เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของ 1- MCP ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) ในบรอคโคลี่ที่ผ่านการให้ความร้อน

นำบร็อคโคลี่มารมด้วย 1- methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมากระตุ้นให้ ความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที และที่ไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) หลังจากนั้นนำมาเก็บที่ 20˚C และ 10˚C เป็นเวลา 0 ,12 ,24 ,48 ชั่วโมง ต่อการเกิด PCD แบ่งเป็นชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 รมด้วย 1-MCP ความเข็มข้น 1 ไมโคลิตร แล้วไม่ได้ให้ความร้อน นำมาเก็บที่ 20˚C เป็นเวลา 0 ,12 ,24 ,48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 2 รมด้วย 1-MCP ความเข็มข้น 1 ไมโคลิตร แล้วไม่ได้ให้ความร้อน นำมาเก็บที่ 10˚C เป็นเวลา 0 ,12 ,24 ,48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 3 รมด้วย 1-MCP ความเข็มข้น 1 ไมโคลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50˚C 10 นาที แล้วนำมาเก็บที่ 20˚C เป็นเวลา 0 ,12 ,24 ,48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 4 รมด้วย 1-MCP ความเข็มข้น 1 ไมโคลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50˚C 10 นาที แล้วนำมาเก็บที่ 10˚C เป็นเวลา 0 ,12 ,24 ,48 ชั่วโมง

บันทึกผลการทดลอง โดยวิเคราะห์ดังนี้

3.2.1 การเหลืองของดอก

บันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงสีของดอกย□อย

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงสี (L, b, H°)

วัดค□าการเปลี่ยนแปลงสีของดอกบร็อคโคลีโดยใช□เครื่องวัดสี Colorimeter (Minolta CR-300,Osaka, Japan) วัดด□านบนของดอก 3 จุด (ดัดแปลงจาก Ku และ Wills, 1999) รายงานผลโดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของค□า Hue angle ค□าความสว□าง และการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป□นสีเหลือง

$$H° = \tan^{-1} (a / b)$$

โดยที่ a คือ เหลือง / น้ำเงิน (yellow / blue)

b คือ แดง / เขียว (red / green)

L คือ ค□าความสว□างของสี

การอ□านผล คือ ถ□าค□าที่ได□อยู□ใกล□ 90° แสดงให□เห็นว□าดอกเกิดการเปลี่ยนเป□นสีเหลืองทั้งหมด แต□ถ้าค□าที่ได□อยู□ใกล□180° แสดงให□เห็นว□าดอกยังเป□นสีเขียว

3.2.3 ปริมาณคลอโรฟ□ลล□

นำดอกบร็อคโคลี 1 กรัม ผสมกับสารละลาย acetone ความเข□มข□นร□อยละ 80 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บดให□ละเอียดด□วยทรายในโกร□งบดละเอียด (Purified acid sand) แล□วกรองเอาส□วนของสารละลายที่สกัดได□ด□วยกระดาษกรองเบอร□ 1 ปรับปริมาตรสารละลายที่ได□ให□ครบ 100 มิลลิลิตร ด□วย acetone ความเข□มข□นร□อยละ 80 หลังจากนั้นนำเอาสารละลายที่ได□ไปวัดค□าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได□ด□วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Spectrophotometer (Shimadzu,Japan) และเปรียบเทียบกับสารละลาย acetone ความเข□มข□นร□อยละ 80 (blank) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร นำค□าที่ได□มาคำนวณตามสมการดังต□อไปนี้ (Coursey, 1983)

Chlorophyll a = 12.7A663 – 2.69A645

Chlorophyll b = 22.9A645 – 4.68A663

Chlorophyll a + b = 20.2A663 – 8.02A645

กำหนดให□A คือค□าการดูดกลืนแสงที่อ□านได□จากความยาวช□วงคลื่นที่ใช□ในการทดสอบ (นาโนเมตร)

3.2.6 การผลิตเอทิลีน (Gemma และคณะ, 1994)

การผลิตเอทิลีนของดอกบร็อคโคลีวัดได□โดยการนำเอาส□วนของก□านดอกย□อยเก็บไว□ในภาชนะที่ปิดสนิทที่มีปริมาตร 390 มิลลิลิตร เก็บในที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป□นเวลา 5 ชั่วโมง แล□วใช□กระบอกเข็มฉีดยาดูดเอาอากาศภายในกล□องปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาฉีดเข□าเครื่องวัดปริมาณก□าซ Gas chromatograph (Shimadzu, Japan) รุ□น 14A สำหรับการวิเคราะห□ก□าซเอทิลีน ใช□ column ชนิด porapack Q (Mesh 60/80) โดยใช□สภาพของการวัดดังนี้

Column	Porapack Q
Column temperature	180 องศาเซลเซียส
Inject temperature	120 องศาเซลเซียส
Detector	TCD
Carrier gas	N2

3.2.7 อัตราการหายใจ (Gemma และคณะ, 1994)

อัตราการหายใจของดอกบร็อคโคลีวัดได□จากปริมาณก□าซคาร□บอนไดออกไซด□ที่บร็อคโคลีผลิตขึ้น โดยการนำเอาส□วนของดอกเก็บไว□ในภาชนะที่ป□ดสนิทที่มีปริมาตร 390 มิลลิลิตร เก็บในที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป□นเวลา 5 ชั่วโมง ใช□กระบอกเข็มฉีดยาดูดเอาอากาศภายใน

กล□องมา 1 มิลลิลิฉีดเข□าเครื่องวัดปริมาณก□าซ Gas chromatograph (Shimadzu, Japan) รุ□น 8A โดยใช□สภาพของการวัดดังนี้

Column	Porapack Q
Column temperature	150 องศาเซลเซียส
Inject temperature	100 องศาเซลเซียส
Detector	TCD
Carrier gas	He

3.2.8 สกัด DNA เพื่อตรวจสอบ DNA laddering (Genomic Mini Kit, Geneaid Co., Ltd)

นำตัวอย่างบรอคโคลี่มา 50 มิลลิกัมบดโดยผสม 400 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ GP1 และ 5 ไมโครลิตรของ RNAse A ในหลอดและผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที ในระหว่างที่บ่มให้เขย่าหลอดทุกๆ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารบัฟเฟอร์ GP2 ลงไป 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex หลังจากนั้นวางไว้บนน้ำแข็ง 3 นาที นำตัวอย่างที่บ่มแล้วย้ายลงใส่ใน filter column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 x g นาน 1 นาที นำสารละลายที่ได้นำมาย้ายใส่ใน หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ GP3 (ผสม Isopropanol แล้ว) 1.5 เท่าของปริมาณสารละลายตัวอย่าง แล้วนำไป vortex นาน 5 วินาที หลังจากนั้นย้ายสารตัวอย่างที่ได้ไปใส่ใน GD column และ collection tube และนำไปปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 2 นาที นำสารส่วน supernatant ทิ้งไป เหลือกแต่ GD column หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W1 400 ไมโครลิตรลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยง 30 วินาที นำสารละลายใสส่วน supernatant ทิ้ง และเติม wash บัฟเฟอร์ ปริมาณ 600 ไมโครลิตร ลงไปใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 30 วินาที แล้วนำสารละลายส่วนใสทิ้งไป นำ GD column ไปใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาทีเพื่อจะดึงดีเอนเอที่ติดกับ GD column ลงมา หลังจากนั้นจะได้ดีเอนเอที่อยู่ในหลอด microcentrifuge และนำดีเอนเอที่ได้ มาแยกโดยใช้อิเลคโตรโฟลิซิสบนวุ้นเจลอะกาโลส (Agarose gel Electrophoresis) oe

3.2.9 ตรวจสอบ Triphenyl tetrazolium chloride (TTC reduction) (Ishikawa et al., 1995**)**

การวัดค่าความมีชีวิตโดยวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ NADH dehydrogenase โดยวิธี Triphenyl tetrazolium chloride assay โดยนำตัวอย่างบรอคโคลี่ 0.2 g FW ล้างด้วย sterile water 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ตัวอย่างลงในหลอดทดลองที่มี 4 ml ของ 0.08% TTC (Triphenyl tetrazolium chloride) ใน 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5 ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง ที่ 23ºC ในที่มืด กรองเอาตัวอย่างออก นำ

บัฟเฟอร์ทิ้งไป และนำตัวอย่างบรอคโคลี่มาสกัดสาร reduced TTC ออกโดยใส่ 95% ethanol 5 ml และวางทิ้งไว้ ในที่มืด 24 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง พอครบเวลา นำมากรอง หลังจากนั้นนำสารละลายสีแดงของ reduced TTC ที่สกัดออกจากบรอคโคลี่ไปวัด ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่า OD 485 nm

3.2.10 การวิเคราะห□ข□อมูล

วิเคราะห□ข□อมูลโดยใช□โปรแกรม IRRISTAT วิเคราะห□สถิติ ANOVA (Analysis of Variance) โดยที่แต□ละวิธีการทดลองมีทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.11 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห□องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล□าธนบุรี (บางขุนเทียน)