บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 <u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผลพริกสดในระหว่างการเก็บรักษา

ทำการสุ่มผลพริกสดพันธุ์ Super Hot ที่แสดงอาการผลเน่าเสียมาทำการแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียโดยวิธี Tissue transplanting method (Dhingro และ Shinchair, 1986) จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบการเกิดโรคตามวิธีของ Koch's postulation และทำการจำแนก Genus และ Species ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียโดยกล้องจุลทรรศน์

3.2 <u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาของการใช้โอโซนเพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุของการเน่าเสียของผลพริกสดในสภาพ *in vitro*

นำเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพโอโซนที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ โดยเตรียมสปอร์ของเชื้อรา ความเข้มข้น 1 x10^4 spore/ml ใส่ในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาให้ก๊าซโอโซนผ่านใน spore suspension ของเชื้อราแต่ละชนิดโดยมีปัจจัยการทดลอง ดังต่อไปนี้

ปัจจัยที่ 1 ปริมาณโอโซนที่ความเข้มข้น 0, 500 และ 1000 mg/hr

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาที่ให้โอโซน นาน 30, 60, 90 นาที

จากนั้นนำสปอร์ของเชื้อราก๊าซโอโซนผ่านใน spore suspension ปริมาตร 0.1 ml มาเกลี่ยลงบนอาหารเชื้อ Potato dextrose agar โดยแต่ละทรีตเมนท์มี 3 ซ้ำ และตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 วัน และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การเจริญของโคโลนีเชื้อรา

3.3 <u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาผลของการใช้โอโซนต่อการป้องกันการเน่าเสีย การเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระของผลพริกสดในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลพริกสดพันธุ์ Super Hot มาทำการคัดเลือกผลที่สมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคและแมลงเข้าทำลายมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด จากนั้นปลูกด้วยเชื้อราที่แยกได้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลพริกมาแช่ในน้ำที่มีแหล่งให้กำเนิดโอโซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการทำลายราจากการทดลองในข้อ 3.2 สำหรับชุดควบคุม คือ ผลพริกที่ปลูกเชื้อราและแช่ในน้ำสะอาด เป็นเวลาเดียวกับพริกที่แช่ในน้ำโอโซน จากนั้นนำผลพริกขึ้นมาสะเด็ดน้ำให้แห้ง และบรรจุ

ลงในถาดโฟมจำนวน 100 กรัมต่อถาด หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติก จำนวน 3 ถาดต่อทรีตเมนท์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และทำการบันทึกผลการทดลองในวันที่ 0, 5 และ 10 ดังนี้

ด้านการเกิดโรค

1. การเกิดเน่าเสีย โดยการนับจำนวนผลพริกที่ปรากฏผลเน่าเสีย ในแต่ละถาดนับจำนวนเมล็ด
2. ความรุนแรงของการเน่าเสีย โดยการให้คะแนนความรุนแรง และรายงานผลในหน่วยคะแนน ดังนี้

   0 คะแนน ไม่ปรากฏอาการเน่าเสีย

   1 คะแนน 0.1-5 % ของพื้นที่ผลพริก

   2 คะแนน 5.1-10 % ของพื้นที่ผลพริก

   3 คะแนน 10.1-15 % ของพื้นที่ผลพริก

   4 คะแนน 15.1-20 % ของพื้นที่ผลพริก

   5 คะแนน มากกว่า 20.1% ของพื้นที่ผลพริก

ด้านคุณภาพ

1. การสูญเสียน้ำหนักสดของผลพริก โดยการชั่งน้ำหนัก และรายงานผลในหน่วย เปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลักการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

2. การเปลี่ยนแปลงสีของผล

   โดยเครื่องวัดสี และรายงานผลในค่า L, a, b, Hue angle นำถาดโฟมที่บรรจุพริกมาทำการวัดสีพริก โดยใช้เครื่องวัดสีตามระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 5 และ 10

3. ความแน่นเนื้อ

   โดยใช้เครื่อง Texture analyser โดยใช้หัวเข็ม นำพริกมาวางที่ฐานของเครื่อง โดยความเร็วที่ 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ค่าที่ได้แสดงหน่วยเป็นนิวตัน

4. อัตราการหายใจ โดยวัดปริมาณ CO_2 โดยวิธีของ Gamma et al. (1994)

   นำพริกพันธุ์ Super hot ทรีตเมนต์ละ 7 ผล ชั่งน้ำหนัก หลักจากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติกปริมาณ 450 มิลลิลิตรทำการปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลักจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC – 2014) นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณอัตราการหายใจ แสดงผลในหน่วย mg CO_2/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$CO_2 \text{ Production (mg } CO_2\text{/kg.hr)} = \frac{\text{void} \times (CO2\text{-}0.03)}{100 \times g \times t} \times \frac{4{,}400}{22.4(1+T/273)}$$

กำหนดให้

Void = ปริมาตรที่วางในกล่อง (มิลลิลิตร)

CO_2 = ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (ร้อยละ)

g = น้ำหนักพริกพันธุ์ Super hot (กรัม)

t = เวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)

T = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

5. การผลิตเอทธิลีน โดยวิธีของ Gamma et al. (1994)

นำพริกพันธุ์ Super hot ทรีตเมนต์ละ 7 ผล ชั่งน้ำหนัก หลักจากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติกปริมาณ 450 มิลลิลิตรทำการปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลักจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC – 2014) นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณอัตราการผลิตเอทิลีน แสดงผลในหน่วย µl C_2H_4/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\text{อัตราการผลิตเอทิลีน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนที่ได้} \times (\text{ปริมาตรภาชนะ(ml)} - \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)} \times \text{เวลาในการจับเวลา}}$$

6. ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบรรจุ

ทำการวัดโดยใช้เครื่องวัดก๊าซในภาชนะบรรจุ Headspace Gas Analyzer รุ่น 900141 โดยการตั้งค่าที่ตัวเครื่องเป็นศูนย์ ติด Septum บนบรรจุภัณฑ์แล้วนำเข็มที่ต่อสายตรงตัวเครื่องกดผ่าน Septum ลงไปภายในบรรจุภัณฑ์ กดปุ่มเพื่อทดสอบตัวอย่าง

ด้านการเปลี่ยนแปลงทางกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. ปริมาณ Ascorbic acid ตามวิธีการของ Roe et al. (1948)

นำเนื้อพริกพันธุ์ Super hot ปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารละลาย metaphosphoric acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer หลังจากนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปทำการหาปริมาณ Total ascorbic acid โดยนำสารละลายตัวอย่าง 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย indophenols (ASA) ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที (หากสารเป็นสีแดง-ชมพู จึงเติมสารในขั้นต่อไป แต่ถ้าสีแดง-ชมพูจางหายไป ต้องทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย metaphosphoric acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเติมสารในขั้นตอนต่อไป) เติมสารละลาย thiourea ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และ 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNP) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (ยกเว้น Blank:หลอดที่ไม่เติมตัวอย่าง) ทำการบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง แล้วเติม Sulfuric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหาปริมาณ ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. ปริมาณ anthocyanin ตามวิธีการของ Cheng and Breen (1991)

<u>การเตรียมสารละลาย pH</u>

<u>Buffer pH 1</u> **:** เตรียมสาร KCl ปริมาณ 1.49 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลายเข้มข้น HCl ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนาสารละลาย 2 ชนิดข้างต้นผสมกันโดยใช้สารละลาย KCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย HCl ปริมาตร 67 มิลลิลิตร ค่า pH อยู่ในช่วง 1.0 ± 0.1

<u>Buffer pH 4.5</u> **:** ชั่งสาร Sodium acetate ปริมาตร 1.64 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่าpH อยู่ในช่วง 4.5 ± 0.1

<u>วิธีการสกัดตัวอย่าง</u>

นำพริกจำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer หลังจากนั้นบ่มด้วยเครื่อง sonicate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้ง

ไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไป centrifuged ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นาส่วนใสด้านบนมาทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์

pH 1: ใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากวิธีการสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย buffer pH 1 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

pH 4.5: ใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากวิธีการสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย buffer pH 4.5 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

นำสารที่ได้ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร

สูตรการคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสง = (A510nmpH 1 – A700nmpH 1) – (A510nmpH 4.5 – A700nmpH 4.5)

$$\text{Anthocyanin (\%)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสง} \times MW \times \text{dilution factor} \times V \times 100}{\epsilon \times 1 \times W}$$

ϵ = ค่า coefficient extinction มีค่าเท่ากับ 26900 L.mol-1 cm-1

MW = น้ำหนักมวลโมเลกุลของ anthocyanin มีค่าเท่ากับ 449.2

V = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิกรัม)

3. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Peroxidase (POD) ตามวิธีการของ Wang et al. (2005)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละสาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 2 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,460 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที และนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์

เติมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ก่อนทำการวิเคราะห์แต่ละหลอด จะต้องเติมสารละลาย guaicol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรในโหมด Kinetic ส่วนBlank: หลอดที่ไม่เติมตัวอย่างให้เติมด้วย สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลาย guaicol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

4. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ตามวิธีการของ Ukeda et al. (1997)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารละสาย 50 มิลลิโมล phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 0.1 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 40 นาทีนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์</u>

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ได้แก่

1.สารละลาย 50 มิลลิโมล phosphate buffer pH 7.0

2. สารละลาย 50 มิลลิโมล $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer pH 10.2

3. สารละลาย 1.0 มิลลิโมล Nitrotetrazolium Blue chloride (NBT)

4. สารละลาย 4.0 มิลลิโมล Xanthine

5. สารละลาย 3.0 มิลลิโมล Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

6. สารละลาย Bovine Serum Albumin 0.15% (w/v)

7. สารละลาย Xanthine Oxidase

8. สารละลาย 80 มิลลิโมล $CuCl_2$

เตรียมสารละลาย reaction base mixture (เติมทีละสารลงในหลอดทดลอง) ประกอบด้วย

- 50 มิลลิโมล $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer pH 10.2 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร
- สารละลาย 1.0 มิลลิโมล NBT ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 4.0 มิลลิโมล Xanthine ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 3.0 มิลลิโมล EDTA ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 8.0 มิลลิโมล $CuCl_2$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

<u>การวิเคราะห์</u>

นำส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย reaction base mixture ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Xanthine Oxidase 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 8.0 มิลลิโมล $CuCl_2$ ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ในโหมด Photometric

5. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Catalase (CAT) ตามวิธีการของ Pukacka and Ratajezak (2005)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละสาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 2 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,460 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

<u>การวิเคราะห์</u>

เติมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ก่อนทำการวิเคราะห์แต่ละหลอด จะต้องเติมสารละลาย hydrogen peroxide (H_2O_2) 24 มิลลิโมล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตรในโหมด Kinetic ส่วนBlank: หลอดที่ไม่เติมตัวอย่างให้เติมด้วย สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลาย H_2O_2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.4 <u>การทดลองที่ 4</u> ศึกษาผลของการใช้โอโซนร่วมกับความร้อน ต่อการป้องกันการเน่าเสีย การเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพ และกิจกรรมของการต้านอนุมูลอิสระของผลพริกสดในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลพริกสดพันธุ์ Super Hot มาทำการคัดเลือกผลที่สมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคและแมลงเข้าทำลายมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด จากนั้นปลูกด้วยเชื้อราที่แยกได้การทดลองที่ 3.1 นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำผลพริกมาแช่ในน้ำสะอาด (ชุดควบคุม) หรือน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อราจากการทดลองในข้อ 3.2 ร่วมกับความร้อนดังต่อไปนี้

ทรีตเมนท์ที่ 1 แช่ผลพริกในน้ำสะอาดที่อุณหภูมิห้อง

ทรีตเมนท์ที่ 2 แช่ผลพริกในน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราจากการทดลองที่ 3.2

ทรีตเมนท์ที่ 3 แช่ผลพริกในน้ำโอโซนที่ร้อน (40 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลานาน 5 นาที ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราจากการทดลองที่ 3.2

ทรีตเมนท์ที่ 4 แช่ผลพริกในน้ำโอโซนที่ร้อน (50 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลานาน 1 นาที ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราจากการทดลองที่ 3.2

จากนั้นนำผลพริกขึ้นมาสะเด็ดน้ำให้แห้ง และบรรจุลงในถาดโฟมจำนวน 100 กรัมต่อถาด หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติก จำนวน 3 ถาดต่อทรีตเมนท์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และทำการบันทึกผลการทดลองในวันที่ 0, 5 และ 10 วัน ดังนี้

ด้านการเกิดโรค

1. การเกิดเน่าเสีย โดยการนับจำนวนผลพริกที่ปรากฏผลเน่าเสีย ในแต่ละถาดนับจำนวนเมล็ด
2. ความรุนแรงของการเน่าเสีย โดยการให้คะแนนความรุนแรง และรายงานผลในหน่วย คะแนน ดังนี้

0 คะแนน ไม่ปรากฏอาการเน่าเสีย

1 คะแนน 0.1-5 % ของพื้นที่

2 คะแนน 5.1-10 % ของพื้นที่

3 คะแนน 10.1-15 % ของพื้นที่

4 คะแนน 15.1-20 % ของพื้นที่

5 คะแนน มากกว่า 20.1% ของพื้นที่

ด้านคุณภาพ

1. การสูญเสียน้ำหนักสดของผลพริก โดยการชั่งน้ำหนัก และรายงานผลในหน่วย เปอร์เซ็นต์โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลักการเก็บรักษา} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

2. การเปลี่ยนแปลงสีของผล

โดยเครื่องวัดสี และรายงานผลในค่า L, a, b, Hue angle นำถาดโฟมที่บรรจุพริกมาทำการวัดสีพริก โดยใช้เครื่องวัดสีตามระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 5 และ 10

3. ความแน่นเนื้อ

โดยใช้เครื่อง Texture analyser โดยใช้หัวเข็ม นำพริกมาวางที่ฐานของเครื่อง โดยความเร็วที่ 2 มิลลิเมตรต่อวินาที ค่าที่ได้แสดงหน่วยเป็นนิวตัน

4. อัตราการหายใจ โดยวัดปริมาณ CO_2 โดยวิธีของ Gamma et al. (1994)

นำพริกพันธุ์ Super hot ทรีตเมนต์ละ 7 ผล ชั่งน้ำหนัก หลักจากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติกปริมาณ 450 มิลลิลิตรทำการปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลักจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC – 2014) นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณอัตราการหายใจ แสดงผลในหน่วย mg CO_2/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$CO_2 \text{ Production (mg } CO_2\text{/kg.hr)} = \frac{\text{void} \times (CO2-0.03)}{100 \times g \times t} \times \frac{4{,}400}{22.4(1+T/273)}$$

กำหนดให้

Void = ปริมาตรที่วางในกล่อง (มิลลิลิตร)

CO_2 = ปริมาตรก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (ร้อยละ)

g = น้ำหนักพริกพันธุ์ Super hot (กรัม)

t = เวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)

T = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

5. การผลิตเอทธิลีน โดยวิธีของ Gamma et al. (1994)

นำพริกพันธุ์ Super hot ทรีตเมนต์ละ 7 ผล ชั่งน้ำหนัก หลักจากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติกปริมาณ 450 มิลลิลิตรทำการปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลักจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC – 2014) นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณอัตราการผลิตเอทิลีน แสดงผลในหน่วย µl C_2H_4/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$\text{อัตราการผลิตเอทิลีน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนที่ได้} \times (\text{ปริมาตรภาชนะ(ml)} - \text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)} \times \text{เวลาในการจับเวลา}}$$

6. ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะบรรจุ

ทำการวัดโดยใช้เครื่องวัดก๊าซในภาชนะบรรจุ Headspace Gas Analyzer รุ่น 900141 โดยการตั้งค่าที่ตัวเครื่องเป็นศูนย์ ติด Septum บนบรรจุภัณฑ์แล้วนำเข็มที่ต่อสายตรงตัวเครื่องกดผ่าน Septum ลงไปภายในบรรจุภัณฑ์ กดปุ่มเพื่อทดสอบตัวอย่าง

ด้านการเปลี่ยนแปลงทางกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. ปริมาณ Ascorbic acid ตามวิธีการของ Roe et al. (1948)

นำเนื้อพริกพันธุ์ Super hot ปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารละลาย metaphosphoric acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer หลังจากนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้ไปทำการหาปริมาณ Total ascorbic acid โดยนำสารละลายตัวอย่าง 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย indophenols (ASA) ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที (หากสารเป็นสีแดง-ชมพู จึงเติมสารในขั้นต่อไป แต่ถ้าสีแดง-ชมพูจางหายไป ต้องทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารลาย metaphosphoric acid ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเติมสารในขั้นตอนต่อไป) เติมสารละลาย thiourea ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และ 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNP) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (ยกเว้น Blank:หลอดที่ไม่เติม

ตัวอย่าง) ทำการบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง แล้วเติม Sulfuric acid ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหาปริมาณ ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. ปริมาณ anthocyanin ตามวิธีการของ Cheng and Breen (1991)

การเตรียมสารละลาย pH

Buffer pH 1 : เตรียมสาร KCl ปริมาณ 1.49 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลายเข้มข้น HCl ปริมาตร 1.7 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนาสารละลาย 2 ชนิดข้างต้นผสมกันโดยใช้สารละลาย KCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย HCl ปริมาตร 67 มิลลิลิตร ค่า pH อยู่ในช่วง 1.0 ± 0.1

Buffer pH 4.5 : ชั่งสาร Sodium acetate ปริมาตร 1.64 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่า pH อยู่ในช่วง 4.5 ± 0.1

วิธีการสกัดตัวอย่าง

นำพริกจำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปั่นละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer หลังจากนั้นบ่มด้วยเครื่อง sonicate ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไป centrifuged ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นาส่วนใสด้านบนมาทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์

pH 1: ใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากวิธีการสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย buffer pH 1 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

pH 4.5: ใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากวิธีการสกัดปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย buffer pH 4.5 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร

นำสารที่ได้ไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร

สูตรการคำนวณ

$$\text{ค่าการดูดกลืนแสง} = (A_{510nmpH\ 1} - A_{700nmpH\ 1}) - (A_{510nmpH\ 4.5} - A_{700nmpH\ 4.5})$$

$$\text{Anthocyanin (\%)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสง} \times MW \times \text{dilution factor} \times V \times 100}{\epsilon \times 1 \times W}$$

ϵ = ค่า coefficient extinction มีค่าเท่ากับ 26900 L.mol-1 cm-1

MW = น้ำหนักมวลโมเลกุลของ anthocyanin มีค่าเท่ากับ 449.2

V = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิกรัม)

3. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Peroxidase (POD) ตามวิธีการของ Wang et al. (2005)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละสาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly (vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 2 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,460 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์</u>

เติมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ก่อนทำการวิเคราะห์แต่ละหลอด จะต้องเติมสารละลาย guaicol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรในโหมด Kinetic ส่วนBlank: หลอดที่ไม่เติมตัวอย่างให้เติมด้วย สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลาย guaicol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

4. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ตามวิธีการของ Ukeda et al. (1997)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 5 กรัม ผสมกับสารละสาย 50 มิลลิโมล phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 0.1 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 40 นาทีนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์</u>

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)

1.สารละลาย 50 มิลลิโมล Phosphate buffer pH 7.0

2. สารละลาย 50 มิลลิโมล $NaCO_3$-$NaHCO_3$ buffer pH 10.2

3. สารละลาย 1.0 มิลลิโมล Nitrotetrazolium Blue chloride (NBT)

4. สารละลาย 4.0 มิลลิโมล Xanthine

5. สารละลาย 3.0 มิลลิโมล Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

6. สารละลาย Bovine Serum Albumin 0.15% (w/v)

7. สารละลาย Xanthine Oxidase

8. สารละลาย 80 มิลลิโมล $CuCl_2$

เตรียมสารละลาย Reaction base mixture (เติมทีละสารลงในหลอดทดลอง) ประกอบด้วย

- 50 มิลลิโมล $NaCO_3NaHCO_3$ buffer pH 10.2 ปริมาตร 2.3 มิลลิลิตร
- สารละลาย 1.0 มิลลิโมล NBT ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 4.0 มิลลิโมล Xanthine ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 3.0 มิลลิโมล EDTA ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
- สารละลาย 8.0 มิลลิโมล $CuCl_2$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

นำส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย reaction base mixture ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Xanthine Oxidase 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 8.0 มิลลิโมล $CuCl_2$ ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ในโหมด Photometric

5. กิจกรรมของเอ็นไซม์ Catalase (CAT) ตามวิธีการของ Pukacka and Ratajezak (2005)

นำพริกมาชั่งปริมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละสาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยสาร Poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ปริมาณ 2 กรัม นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,460 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

การวิเคราะห์

เติมตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ก่อนทำการวิเคราะห์แต่ละหลอด จะต้องเติมสารละลาย hydrogen peroxide (H_2O_2) 24 มิลลิโมล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ที่เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตรในโหมด Kinetic ส่วน Blank คือ หลอดที่ไม่เติมตัวอย่างให้เติมด้วย สารละลาย 0.05 โมลาร์ phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยสารละลาย H_2O_2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.5 <u>การทดลองที่ 5</u> ศึกษาผลของการใช้โอโซนเพื่อลดปริมาณสารเคมีที่ตกค้างอยู่บนผลพริกสด

นำผลพริกสดพันธุ์ Super Hot มาทำการคัดเลือกผลที่สมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคและแมลงเข้าทำลายมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและทำการจุ่มในสารกำจัดศัตรูพืชที่ผสม Tween 20 โดยมีทรีตเมนท์ดังนี้ ทรีตเมนท์ที่ 1 พริกที่ไม่ได้จุ่มสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (ปริมาณสารเคมีที่ปนเปื้อน

มากับพริกเริ่มต้น) สำหรับผลพริกที่จุ่มสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophophates (Chlorpyrifos) ความเข้มข้น 1000 ppm ผสมกับสารเคมีกำจัดเชื้อรากลุ่ม Benzimidazoles (carbendazim) ความเข้มข้น 1000 ppm จากนั้นนำพริกมาผึ่งให้แห้งนาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปแช่ในน้ำที่ผ่านก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์จากการทดลองที่ 3.2 และในน้ำโอโซนที่ร้อนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราจากการทดลองที่ 3.3 (น้ำที่ผ่านก๊าซโอโซนความเข้มข้น 500 ppm นาน 90 นาที) จากนั้นนำผลพริกขึ้นมาสะเด็ดน้ำให้แห้ง และบรรจุลงในถาดโฟมจำนวน 100 กรัมต่อถาด หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกจำนวน 3 ถาดต่อทรีตเมนท์ (ซ้ำ) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และทำการตรวจวัดปริมาณสารเคมีตกค้างบนผลพริกในวันที่ 0, 5 และ 10 วัน (ทรีตเมนท์ที่ 2 3 และ 4) ของการเก็บรักษาโดยการวิเคราะห์สารเคมีกำจัดแมลงกลุ่ม Organophophates โดยการทำส่งไปตรวจวิเคราะห์สารเคมีตกค้างที่ บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) สำนักงานใหญ่ บางเขน กรุงเทพฯ และรายงานผลในหน่วย mg/kg