บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 ครุภัณฑ์

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) Autocal Model PHM 83 บริษัท Radiometer

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Type 1567 บริษัท Sartorius Germany

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง Type 1705 บริษัท Sartorius Germany

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงต่ำ (Centrifuge) Model EBA 3S บริษัท Hettich

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Centrifuge) Model J 2-21 บริษัท Beckman

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic 2000)บริษัท Bausch & Lomb

อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ (Shaking waterbath) Model 01-PF-632 บริษัท Heto

เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography) Model 437A บริษัท Packard (รูปที่ 5)

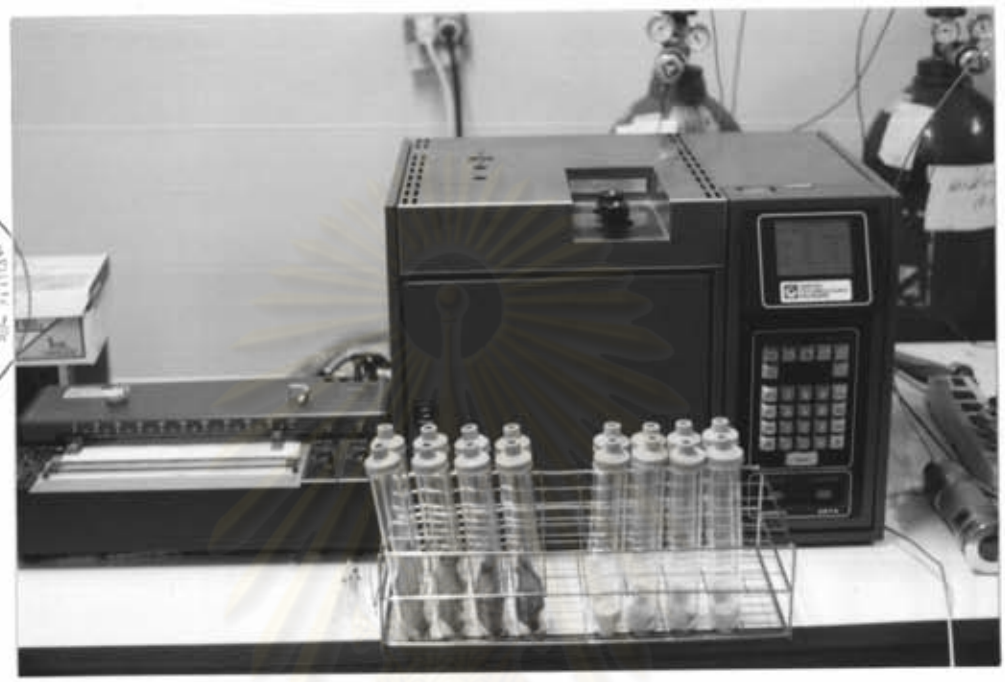
ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) บริษัท Pipetman

Load Cell Instruments 200 N บริษัท J.J. LLoyd Instruments Ltd. England (รูปที่ 6)

Gas Tight Syringe บริษัท Haminton , England

Para Film บริษัท Whatman International Ltd. , England

Filter Paper No.1 บริษัท Whatman International Ltd., England



รูปที่ 5 เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) Model 437 A บริษัท Packard

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 Load Cell Instruments 200 N. บริษัท J.J. LLoya Instruments.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.2.1 สารเคมี (Chemical Reagent)

AG_3 (Gibbereelic acid) บริษัท Fluka

Paraffin wax บริษัท Fluka

L-α-2 (Aminoethoxyvinyl) Glycine (AVG) บริษัท Sigma Chemical Co.,

Pectin บริษัท Sigma Chemical Co.,

Starch Soluble บริษัท BDH Chemical Ltd.

Calcium chloride บริษัท Merck

Sta-Fresh 7055 บริษัท FMC

L-Ethionine บริษัท Sigma Chemical Co.,

L-Methionine บริษัท BDH Chemical Ltd.

Maltose บริษัท Sigma Chemical Co.,

Glucose บริษัท Fluka

เบนเลท โอดี บริษัทดูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด

2.2.2 แก๊ส

เอทธิลีนมาตรฐาน จาก บริษัทไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด

ไนโตรเจน จาก บริษัทไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด

อากาศอัด จาก บริษัทไทยอินดัสเตรียลแก๊ส จำกัด

ไฮโดรเจน จาก บริษัทรัตนโชค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 พืชทดลอง

2.3.1 ผลกล้วยหอมทอง

ผลกล้วยหอมทองซื้อจากสวนเกษตรกรในเขตอำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี ความแก่ (maturity) ของผลกล้วยที่ใช้การเก็บเกี่ยวเพื่อทดลองประมาณ 75-80 เปอร์เซนต์ (5) อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ ลักษณะผิวด้านนอกยังคงมีเหลี่ยมชัดเจน (รูปที่ 7) ซึ่งผลกล้วยหอมทองที่แก่ระยะนี้เหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวเพื่อขนส่งระยะทางไกล เช่น เพื่อการจำหน่ายในตลาดต่างประเทศ

2.3.2 การเตรียมผลกล้วยหอมทองเพื่อบ่ม

- ตัดแยกกล้วยหอมทองออกจากเครือเป็นหวี ๆ และตัดแยกผลกล้วยหอมทองในแต่ละหวีออกเป็นผลเดี่ยว ๆ
- ล้างทำความสะอาดกำจัดยาง
- แช่ผลกล้วยหอมทองในสารละลายเบนเลทโอดี ความเข้มข้น 500 ppm นาน 3 นาที เพื่อป้องกันกำจัดเชื้อรา
- อบด้วยเอทธิลีนความเข้มข้น 10 ppm นาน 12 ชั่วโมง ในภาชนะปิดสนิทปริมาตร 64 ลูกบาศ์กลิตร

2.3.3 การบ่ม

นำผลกล้วยหอมทองที่ผ่านการอบด้วยเอทธิลีน วางในกล่องกระดาษขนาดกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 30x45x20 เซนติเมตร คลุมผลกล้วยหอมทองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์หนา 2 ชั้น นำไปเก็บในห้องบ่มซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 24 $\pm$ 2° เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ประมาณ 75 เปอร์เซนต์

2.3.4 การเก็บตัวอย่างกล้วยหอมทอง เพื่อวัดปริมาตรการผลิตเอทธิลีน

เก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยหอมทองทุก ๆ วันตั้งแต่วันแรกของการบ่มถึงวันที่ 7 ของการบ่มโดยเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำๆละ 1 ผล

รูปที่ 7 ผลกล้วยหอมทอง ความแก่ 75-80 เปอร์เซ็นต์ ผิวด้านนอกยังคงมีเหลียมชัดเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.5 การเก็บตัวอย่างก้านและเปลือกที่อยู่ติดกับก้านผลกล้วยหอมเพื่อวัดปริมาณการผลิตเอทธิลีน

เก็บตัวอย่างก้านและเปลือกที่อยู่ติดกับก้านผลกล้วยหอมทอง (รูปที่ 8)ทุก ๆ วันของการบ่มตั้งแต่วันแรกของการบ่มถึงวันที่ 7 ของการบ่ม โดยตัดส่วนของก้านและเปลือกที่ติดกับก้านผล (วัดจากปลายก้านผลเข้ามาสู่ส่วนของเปลือกความยาว 3 เซนติเมตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ผล)

2.3.6 การเก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยหอมทองบริเวณขั้วผลเพื่อวัดความแน่นเปลือก

เก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยหอมทองในวันที่ 1,3,5 และ 7 ของการบ่มโดยการเก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยบริเวณที่ติดกับก้านผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตัวอย่างเท่ากับ 1 เซนติเมตร จำนวน 3 ผล ๆ ละ 2 ตัวอย่าง

2.3.7 การเก็บตัวอย่างก้านและเปลือกที่ติดอยู่กับก้านผลกล้วยหอมทอง (รูปที่ 8) เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

เก็บตัวอย่างก้านและเปลือกที่ติดอยู่กับก้ารผลกล้วยหอมทองในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการบ่ม โดยใช้วิธีการเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.4

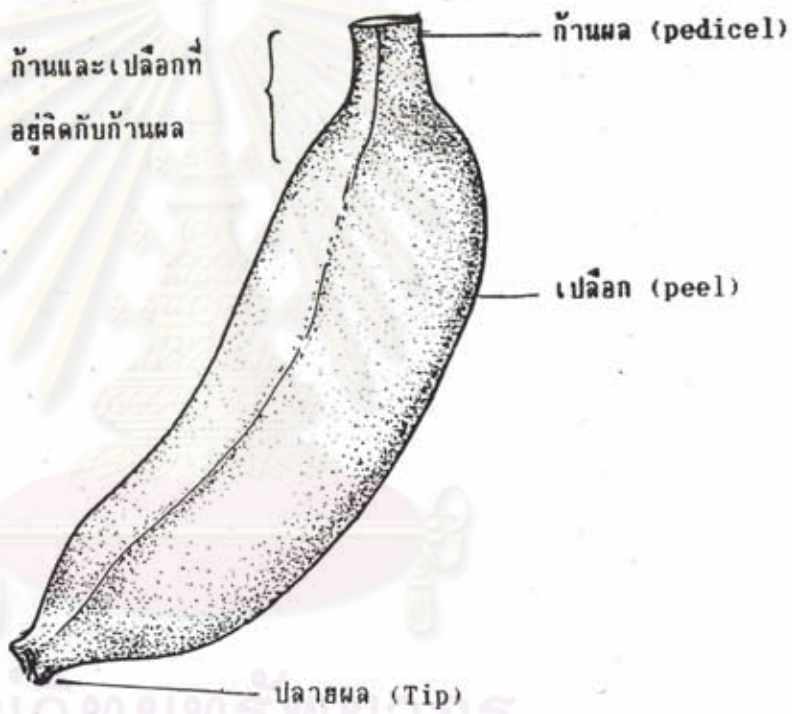
2.3.8 การเก็บตัวอย่างเนื้อกล้วยหอมทองบริเวณขั้วผลเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลที่ละลายทั้งหมด(Total sugar)

เก็บตัวอย่างเนื้อกล้วยหอมทองในวันที่ 1,3,5 และ 7 ของการบ่ม โดยเก็บตัวอย่างเนื้อกล้วยหอมทองตำแหน่งที่ห่างจากปลายขั้วผล 1เซนติเมตร จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ผล

2.4 การใช้สารยับยั้งการสูญเสียความแน่นเปลือก

2.4.1 ชนิดและความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง

สารที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 10-90 เปอร์เซนต์ กรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ความเข้มข้น 300,600 และ 900 ppm



รูปที่ 8 ส่วนประกอบภายนอกของผลกล้วยหอมทอง
Musa (AAA Group, Gros Michel)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอทไธโอนีน (Ethionine) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เมทไธโอนีน (Methionine) ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ สเตเฟรส 7055 (Sta Fresh 7055) ผสมกับน้ำ (อัตราส่วน 1:5 1:3,1:2 และ 1:1) พาราฟินเหลว (Liquid Paraffin)

2.4.2 วิธีการทดลองยับยั้งการสุก

สารต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองเตรียมอยู่ในรูปสารละลาย โดยเติมไตรตัน X100 (Triton X100) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ใช้สำลีชุบสารละลายทาบริเวณเปลือกกล้วยหอมทองก่อนกระตุ้นการสุกด้วยเอทธิลีน ยกเว้นพาราฟินเหลว และ Sta Fresh 7055 ซึ่งทาผลกล้วยหอมทองทั้งผลภายหลังจากกระตุ้นด้วยเอทธิลีน ทั้งนี้เพราะการทาพาราฟินเหลวและ Sta Fresh 7055 ก่อนอบด้วยเอทธิลีนจะมีผลทำให้เอทธิลีนจากภายนอกซึมผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อได้น้อย จึงเกิดการสังเคราะห์เอทธิลีนแบบอัตโนมัติเกิดขึ้นน้อยด้วย การสุกของผลกล้วยหอมทองจะเกิดขึ้นช้า

2.5 การเตรียมสารละลาย

2.5.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ เซลลูเลส

2.5.1.1 สารละลาย 0.04 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 5.5

ชั่งสารโซเดียมอะซีเตรท 2.789 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรแล้วเติมกรดอะซีติก 1 โมลาร์ 6.295 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายกับน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์)

2.5.1.2 สารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.8

ชั่งสารโซเดียมอะซีเตรท 1.006 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตรแล้วเติมกรดอะซีติก 1 โมลาร์ 12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์)

2.5.1.3 สารละลายกรดอะซีติก 1 โมลาร์

ตวงกรดอะซีติก 57.190 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2.5.1.4 สารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 11.688 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่งแล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2.5.1.5 สารละลาย 2 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่งแล้วปรับปริมาตรจนกครบ 500 มิลลิลิตร

2.5.1.6 สารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซีเตดบัฟเฟอร์ pH 5.0

ชั่งสารโซเดียมอะซีเตด 517 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่งแล้วเติมกรดอะซีติก 1 โมลาร์ 3.7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์)

2.5.1.7 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS)

ชั่งกรดไดไนโตรซาลซิลิก 10 กรัม ฟินอล 2 กรัม โซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม โปตัสเซียม-โซเดียมตาร์เตรท 200 กรัมละลายในสารละลาย 2 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.5.1.8 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 10 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมอะซีเตดบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์/ลิตร pH 5.0)

2.5.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัด และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา อะมัยเลส

2.5.2.1 สารละลาย 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6.9

ชั่งสารโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.077 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ชั่งสารไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.123 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 ผสมกันปรับปริมาตร เป็น 1000 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วยโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์)

2.5.2.2 สารละลาย 1 เปอร์เซนต์ของแป้งใน 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.9 กับ 0.007 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 0.1227 กรัม ละลายใน 300 มิลลิลิตร ของ 0.02 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.9 เติม 3 กรัมของแป้ง (Starch Soluble) นำไปกวน (Stir) ตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 50° เซลเซียส

2.5.2.3 สารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ มอลโตสโดยชั่ง 0.036 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพคตินเมธิล เอสเตอเลส

2.5.3.1 สารละลาย 1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 58.44 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวนหนึ่ง แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5.3.2 สารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์เพคติน

ชั่งสารแพคติน 2.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 50°เซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปกวน (Stir) ตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer.

2.5.3.3 สารละลาย 0.003 โมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5

ชั่งสารโปรแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.116 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ชั่งสารไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.709 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายทั้ง 2 ผสมกันปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร (ปรับ pH ด้วย โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์)

2.5.3.4 สารละลาย 0.01 เปอร์เซนต์บรอมไธมอล บลูใน 0.003 โมลาร์ โปรแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์

ชั่งสารบรอมไธมอล บลู 0.003 กรัมละลายใน 30 มิลลิลิตรของ 0.003 โมลาร์ โปรแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5

2.5.3.5 สารละลายกรดอะซีติก มาตรฐาน

เตรียมสารละลาย 0.87 มิลลิโมลาร์กรดอะซีติก โดยใช้ 1 โมลาร์กรดอะซิติก 87 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)

2.5.4.1 สารละลาย 80 เปอร์เซนต์ฟีนอล

ชั่งสารฟีนอล 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 20 มิลลิลิตร

2.5.5 สารละลาย 300, 600และ 900 ppm GA_3

ชั่งสาร GA_3 180 มิลลิกรัม ละลายใน 75 เปอร์เซนต์เอธานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย GA_3 ความเข้มข้น 900 ppm แล้วจึงนำมาเจือจางเป็น 300 และ 600 ppm

2.5.6 สารละลาย 0.1 โมลาร์ แอลเมทไธโอนีน

ชั่งสารแอลเมทไธโอนีน 1.492 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.7 สารละลาย 0.1 โมลาร์ แอลเอทไธโอนีน

ชั่งสารแอลเอทไธโอนีน 1.632 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.5.8 สารละลาย 200 และ 500 ppm อะมิโนเอทอกซีไวนิลไกลซิน(AVG)

ชั่งสารอะมิโนเอทอกซีไวนีล ไกลซิน 25 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิตร คิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 500 ppm จากนั้นนำ 15 มิลลิลิตรของ 500 ppM อะมิโนเอทอกซีไวนิลไกลซิน เติมน้ำกลั่น 22.5 มิลลิลิตร จะได้เป็น 37.5 มิลลิลิตรของ 200 ppm อะมิโนเอทอกซีไวนิลไกลซิน

2.6 การสกัดและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.6.1 เอนไซม์เซลลูเลส

2.6.1.1 การสกัดเอนไซม์เซลลูเลส (36)

ใช้ส่วนของก้านผลและเปลือกที่ติดอยู่กับก้านผลกล้วยหอมทอง 1 กรัมบดในโกร่งที่มี 8 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ (0.04 โมล/ลิตร pH 55)และ 2 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.2 โมล/ลิตร ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส ภายหลังจากบดแล้วทิ้งไว้ 15 นาที นำไป เซนตริฟิวจ์ ที่ 6000 g นาน 20 วินาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

2.6.1.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดย ฟิลเตอร์เปเปอร์เอสเสย์ (Filter paper assay) (37) (รูปที่ 9)

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ในข้อ 2.5.1.1 (จากวันที่ 1, 3 5 และ 7 ของการบ่ม) เติมลงใน 1.0 มิลลิลิตร ของสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ (0.05โมล/ลิตร pH 4.8) ในหลอดทดลองขนาด 18 มิลลิลิตรใส่กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่ตัดขนาด 1 x 6 เซนติเมตร (ประมาณ 50 มิลลิกรัม)ผสมด้วยเครื่องผสม Vortex เพื่อให้กระดาษกรองม้วนเป็นขด ในสารละลาย (รูปที่) อินคิวเบตที่ 50° เซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS.) 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกริยา ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของสารละลายโดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่เกิดจากสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่มีปริมาณกลูโคสตั้งแต่ 100-600 ไมโครกรัม (ภาคผนวกที่ 3) จำนวนมิลลิกรัมกลูโคสที่วัดได้ นำมาคำนวณแอคติวิตีโดย ฟิลเตอร์เปเปอร์แอคติวิตี 1 หน่วย (FP units) คือ ไมโครโมลของกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายต่อนาที ที่สภาวะที่ทำการทดลอง

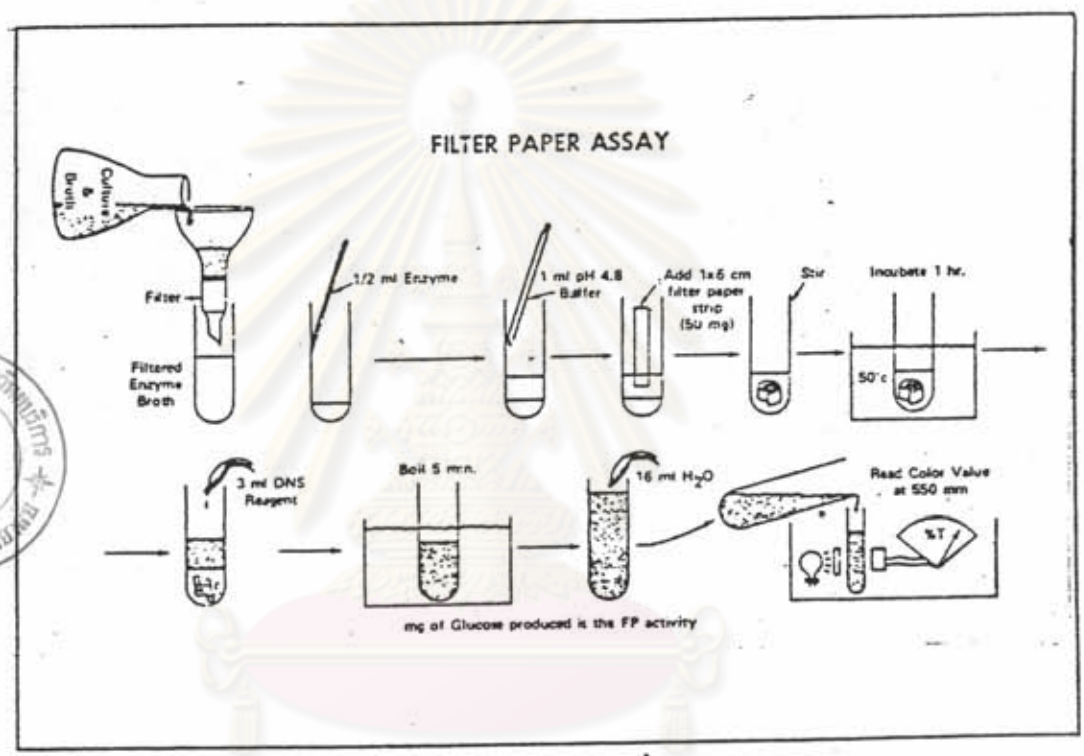
2.6.2 เอนไซม์ แอลฟาอะมัยเลส

2.6.2.1 การสกัดเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส

ใช้เปลือกกล้วยหอมทองบริเวณขั้วผล 1 กรัม บดในโกร่งที่มี 10 มิลลิลิตรของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.02 โมล/ลิตร pH 6.9) ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส หลังจากบดละเอียดแล้วทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปเซนตรีฟิวจ์ที่ 15,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์

2.6.2.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (ดัดแปลงจากวิธีของ Khader S.E.A.และคณะ) (38)

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ในข้อ 2.6.2.1 ปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 700, 300 ,200 และ 150 ไมโครลิตร ในวันที่ 1 , 3 , 5 ,7 ของการบ่มตามลำดับโดยปรับปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้เป็น 1000 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์(0.02 โมล/ลิตร pH 6.9) เติมลงในหลอดทดลองที่มี 0.5 มิลลิลิตรของ



รูปที่ 9 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลสโดยฟิลเตอร์เปเปอร์แอสเสย์ จาก Mandel M และ Sternberg (37)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย 1 เปอร์เซนต์ของแป้ง (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมล/ลิตร pH 6.9 กับโซเดียมคลอไรด์ 0.007 โมล/ลิตร) นำไปอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกริยา ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปรับปริมาตรครั้งสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของสารละลาย โดยเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีที่เกิดจากสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐานที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-100 ไมโครโมล กำหนดหน่วยของเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารละลายสับเสตรท ให้เป็นน้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครโมล ต่อ 30 นาที ในสภาวะที่ทดลอง

2.6.3 เอนไซม์เพคตินเมธิลเอสเตอเรส ดัดแปลงจากวิธีการของ Hagerman และ Austin (39) และ Miller และคณะ (40)

2.6.3.1 การสกัดเอนไซม์เพคตินเมธิลเอสเตอเรส

นำเปลือกกล้วยบริเวณขั้วผล 1 กรัม บดในโกร่งที่มี 10 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (1 โมล/ลิตร) ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส เช่นเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมงกรองเอากากออกด้วยผ้ากรองน่าสาร ละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 20,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์

2.6.3.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพคตินเมธิลเอสเตอเรส

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ในข้อ 2.6.3.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายของสับเสตรทซึ่งประกอบด้วย 2 มิลลิลิตรของสารละลายเพคติน 0.5 เปอร์เซนต์ 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายบรอมไธมอล บลู 0.01 เปอร์เซนต์และน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร หาค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงเทียบกับค่าควบคุมที่ได้จากวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารละลาย 1โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์แทนเอนไซม์ (blank) และตัวอย่างในเวลา 1 นาที นับจากเวลาที่ใส่สารละลายเอนไซม์ลงไปในสารละลายสับเสตรท นำค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณกรดโดยเปรียบเทียบกับค่าความแตกต่างในการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานที่มีความเข้มระหว่าง 0.1-0.6 ไมโครโมล กับ blank (ภาคผนวกที่ 5) คำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นจำนวนไมโครโมลของกรดอะซิติกต่อมิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ต่อเวลา 1 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การวัดความแน่นเปลือก

เก็บตัวอย่างเปลือกบริเวณขั้วผล ไปทดสอบการต้านแรงกดด้วยเครื่อง Load Cell Instrument โดยใช้โพรบทดสอบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ผลที่คำนวณได้มีหน่วยเป็นนิวตัน

2.8 การวัดเอทธิลีน

ทำการวัดเอทธิลีนด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ชนิดใช้ Flame ionization detector และคอลัมน์ porapak N 80/100 ที่อุณหภูมิ 90° เซลเซียส การเตรียมตัวอย่างเอทธิลีน เตรียมโดย

2.8.1 การวัดเอทธิลีน ที่ผลิตจากผลกล้วยหอมทอง

ใช้กล้วยหอมทองตัวอย่างละ 2 ผลใส่ในกล่องพลาสติกขนาดมีปริมาตร 2.83 ลิตร ปิดผาให้แน่นแล้วพันทับด้วยพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันอากาศรั่ว จากนั้นใช้ Syringe แทงผ่านจุกยางที่ผนึกอยู่บนฝาด้านบนเพื่อเก็บตัวอย่างแก๊สภายในไปวัดหาปริมาณเอทธิลีน (รูปที่ 10)

2.8.2 การวัดเอทธิลีนที่สร้างจากก้านผลและเปลือกที่ติดกับก้านผลกล้วยหอมทอง

ใช้เปลือกกล้วยหอมทองบริเวณขั้วผลตัวอย่างละ 2 ผล ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 130 มิลลิลิตรปิดผาให้แน่นด้วยจุกยางและพันทับด้วยพาราฟิล์มทำการเก็บตัวอย่างเอทธิลีนเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.7.1 (รูปที่ 11)

2.8.3 การคำนวณปริมาณเอทธิลีน

คำนวณปริมาณเอทธิลีนโดยกำหนดปริมาตรของเอทธิลีนต่อปริมาตรของภาชนะ คือจำนวนส่วนของเอทธิลีนต่อล้านส่วน (ppm) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 2)

2.9 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ละลายน้ำทั้งหมด(Total sugars) ตามวิธีของ A.O.A.C. (41)

ชั่งตัวอย่างเนื้อกล้วยหอมทองบริเวณห่างจากขั้วผล 1 ซม. น้ำหนัก 1 กรัม นำมาบดจนละเอียด เติมน้ำกลั่น 5 มล. จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำสารละลายส่วนที่ใส 2 มล. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซนต์ 0.1 มล.

รูปที่ 10 กล่องพลาสติกขนาดปริมาตร 2.83 ลิตร ดัดแปลงเพื่อใช้เก็บตัวอย่างเอทธิลีน จากผลกล้วยหอมทองเพื่อวัดหาปริมาณเอทธิลีนตามวิธีการข้อ 2.8.1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 หลอดทดลองขนาด 130 มิลลิลิตรดัดแปลงเพื่อวัดปริมาณเอทธิลีนจากก้านผล และเปลือก ที่ติดอยู่กับก้านผล โดยวิธีการตามข้อ 2.8.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 5 มล. อย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (42) (ภาคผนวกที่ 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย