บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

เงาะพันธุ์โรงเรียน อายุ 100-120 วันหลังจากดอกบาน โดยทำการทดลองในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายน จากสวนผลไม้ของเกษตรกรที่กิ่งอำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง นำมาทำความสะอาดผลเงาะโดยใช้แปรงขนอ่อนปัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ตามขนเงาะออกและตัดขั้วผล คัดผลที่มีขนาด และมีสีเปลือกสม่ำเสมอ ผึ่งให้แห้งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์

ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Growth chamber), เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่งของกรัม, เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer), เครื่อง Gas chromatography (Shimadzu รุ่น GC-14A), เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge), เครื่องวัดปริมาณ Total Soluble Solids (TSS) (Refractrometer รุ่น N-1E), ตู้อบ (Oven 180 °C), เครื่องวัดค่าความแน่นเนื้อ (Penetrometer รุ่น FT 011), แท่นให้ความร้อนและคนสาร (Hot plate & Stirrer) หลอด microcentrifuge, กระบอกตวง, หลอดทดลอง, บีกเกอร์, ปาสเตอร์ปิเปต (Paster pipette), อลูมิเนียม ฟอล์ย (Aluminium foil), , ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep Freezer) อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส, ตู้เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส, ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip), โกร่งบด, แผ่นเทียบสี Royal Horticultural Society (R.H.S.) colour chart, ตารางแปลงค่าสี (R.H.S. Table of Cross-References), ขวดโหลแก้วขนาด 2.4 ลิตร, ขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง, กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา (Syringe and needle), หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร, มีดและเขียง, ตะกร้าพลาสติก, กล่องพลาสติก, นาฬิกาจับเวลา, ที่เจาะกระดาษ, เครื่อง shaker

หมดอายุการเก็บรักษา โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาการสุกบางประการ ได้แก่ การสูญเสียน้ำหนักสด การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลเงาะโดยเทียบกับแผ่นเทียบสี การเกิดสีน้ำตาลในส่วนเปลือกและขนของผลเงาะ การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในเปลือกและเนื้อเงาะ การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณไอออนที่รั่วไหลออกจากเนื้อเยื่อเปลือก การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลในเปลือกเงาะ และการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโธไซยานิน

3.1.2 การวัดการสูญเสียน้ำหนักสด

วัดการสูญเสียน้ำหนักสดโดยชั่งน้ำหนักผลเงาะในแต่ละชุดการทดลองด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง โดยเทียบน้ำหนักวันที่ 0 เป็น 0 % แล้วคำนวณดังสมการ :

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

3.1.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลเงาะ

วัดการเปลี่ยนสีของเปลือกเงาะโดยเทียบกับ Royal Horticultural Society (R.H.S.) color chart จากนั้นนำไปแปลงเป็นระบบ Y x y color space ด้วยตารางแปลงค่าสี (R.H.S. Table of Cross-Reference) ต่อมาแปลงเป็นระบบ L a b color space โดยใช้สูตร จากนั้นนำค่า a และ b มาคำนวณหาค่าการเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีดำ หรือ Hue value ต่อไป (รายละเอียดของแต่ละระบบและสูตรคำนวณระบุในภาคผนวก ก)

3.1.4 การให้คะแนนการเกิดสีน้ำตาลในส่วนเปลือกและขนของผลเงาะ

ให้คะแนนการเกิดสีน้ำตาลในส่วนเปลือกและขนของผลเงาะโดยให้คะแนนตามวิธีของอรษา แกล้วเกษตรกรณ์ (2536) ดังนี้

คะแนนการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก

คะแนน 0 = ปกติ

คะแนน 1 = เปลือกเริ่มมีจุดช้ำหรือ browning ร้อยละ 1-20 ของพื้นที่ผิวผลเงาะ

คะแนน 2 = เปลือกเริ่มมีจุดช้ำหรือ browning ร้อยละ 21-50 ของพื้นที่ผิวผลเงาะ
คะแนน 3 = เปลือกเริ่มมีจุดช้ำหรือ browning ร้อยละ 51-80 ของพื้นที่ผิวผลเงาะ
คะแนน 4 = เปลือกเริ่มมีจุดช้ำหรือ browning ร้อยละ 81-100 ของพื้นที่ผิวผลเงาะ

คะแนนการเปลี่ยนแปลงสีขน
คะแนน 0 = ปกติ
คะแนน 1 = ดำ 1/4 ของความยาวขน
คะแนน 2 = ดำ 1/2 ของความยาวขน โคนขนดำ
คะแนน 3 = ดำ 3/4 ของความยาวขน โคนขนดำ
คะแนน 4 = ดำทั้งหมด

3.1.5 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในเปลือกและเนื้อเงาะ

วัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำในเปลือกและเนื้อเงาะโดยแยกเปลือกและเนื้อเงาะออกจากกัน แล้วชั่งน้ำหนักของเปลือกและเนื้อเงาะ แยกบรรจุลงในซองสีน้ำตาล นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นนำส่วนของผลเงาะที่อบแล้วมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณดังสมการ

$$\% \text{ ปริมาณน้ำในเปลือกหรือเนื้อเงาะ} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}}$$

3.1.6 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids)

วัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids) โดยใช้น้ำคั้นจากเนื้อผลเงาะมาวัดปริมาณ soluble solid concentration โดยใช้ refractometer ค่าที่อ่านได้เป็นองศาบริกซ์ (° Brix)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.7 การวัดปริมาณไอออนที่รั่วไหลออกจากเนื้อเยื่อเปลือก (Gemma *et al*,1994)

วัดปริมาณไอออนที่รั่วไหลออกจากเนื้อเยื่อเปลือก โดยเจาะเนื้อเยื่อส่วนเปลือกด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชิ้น ล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปใส่ใน flask ที่มีน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลายแขวนลอยที่ได้ไปวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง conductometer บันทึกค่า หลังจากนั้นนำไปต้มจนเดือดและวัดค่าการนำไฟฟ้าอีกครั้ง จากนั้นคำนวณร้อยละของการรั่วไหลของไอออนดังสมการ :

$$\% \text{ การรั่วไหลของไอออน} = \frac{\text{ค่าการนำไฟฟ้าก่อนต้ม} \times 100}{\text{ค่าการนำไฟฟ้าหลังต้ม}}$$

3.1.8 การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลในเปลือกเงาะ (Singleton and Rossi, 1965)

วัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลในเปลือกเงาะ สกัดตามวิธีการของ Ketsa and Atantee (1998) โดยนำเนื้อเปลือกหั่นละเอียดจำนวน 3 กรัมใส่โกร่งบดที่แช่เย็นเติม ethanol 80% ที่เย็นลงไปปริมาตร 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดต่อไป

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ดัดแปลงจาก Singleton and Rossi (1965) โดยนำสารละลายส่วนใสที่สกัดได้มาเจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายของ Folin-Ciocalteu reagent 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ผสมให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายของ Na_2CO_3 7.5% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้นี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/ 100 กรัมน้ำหนักสด (mg /100 g fresh weight)

3.1.9 **การวัดปริมาณแอนโธไซยานิน** ดัดแปลงตามวิธีของ Ragana (1997)

วัดปริมาณแอนโธไซยานินโดยนำเปลือกผลเงาะ 1 กรัม หั่นอย่างละเอียดใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี ethanolic HCL 25 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน นำมาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

3.1.10 **วิเคราะห์ผลการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ผล ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.2 ศึกษาผลของสารละลายไคโตซาน ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลเงาะพันธุ์โรงเรียน

3.2.1 **การแช่ผลเงาะในสารละลายไคโตซาน**

คัดเลือกเงาะพันธุ์โรงเรียน อายุ 100-120 วัน หลังจากดอกบาน โดยคัดผลให้มีขนาดเท่าๆ กัน และสีเปลือกมีความสม่ำเสมอ สุ่มผลเงาะมาแช่ลงในสารละลายไคโตซาน (oligomer %DD 80) (v / v) เป็นเวลา 10 นาที โดยแบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

1. ชุดควบคุม (ไม่แช่)
2. แช่น้ำกลั่น
3. แช่ acetic acid 1.0 % (v / v) ความเข้มข้น 5 ppm
4. แช่ acetic acid 1.0 % (v / v) ความเข้มข้น 20 ppm
5. แช่ acetic acid 1.0 % (v / v) ความเข้มข้น100 ppm

6. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 5 ppm
7. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 10 ppm
8. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 20 ppm
9. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 50 ppm
10. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 100 ppm

ผึ่งให้แห้ง บรรจุลงในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) แล้วนำ ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.1

3.3 ศึกษาผลของสารละลายไคโตซานร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลเงาะพันธุ์โรงเรียน

3.3.1 การใช้สารละลายไคโตซานร่วมกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

เลือกความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ และสารละลายไคโตซาน ที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลเงาะพันธุ์โรงเรียนได้ดีที่สุด แล้วนำมาใช้ร่วมกัน คัดเลือกเงาะพันธุ์โรงเรียน อายุ 100-120 วัน หลังจากดอกบาน โดยคัดผลให้มีขนาดเท่าๆกัน และสีเปลือกมีความสม่ำเสมอ สุ่มผลเงาะมาแช่ลงในสารละลายไคโตซาน (oligomer %DD 80) (v / v) และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (w / v) โดยแบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

1. ชุดควบคุม (ไม่แช่)
2. แช่น้ำกลั่น
3. แช่ acetic acid 1.0 % (v / v) ความเข้มข้น 5 ppm
4. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 5 และ 20 ppm
5. แช่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05
6. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 5 ppm และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05
7. แช่สารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 20 ppm และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05

ผึ่งให้แห้ง บรรจุลงในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) แล้วนำ ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างแล้วทำการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับข้อ 3.1 และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของการวัดอัตราการหายใจ แอคติวิตีของเอนไซม์โพลีฟีนอล ออกซิเดส และความแน่นเนื้อของเปลือกผล

3.3.2. การวัดอัตราการหายใจ โดยเครื่อง gas chromatography

วัดอัตราการหายใจ โดยเครื่อง gas chromatography โดย ชั่งน้ำหนักของผลเงาะนำไปเก็บลงในขวดโหลแก้วสำหรับเก็บตัวอย่างแก๊สขนาด 2.4 ลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง ใช้หลอดและเข็มฉีดยา ดึงตัวอย่างแก๊สปริมาตร 10 cm^3 จากขวดโหลมาเก็บแทนที่น้ำเกลือในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง gas chromatography ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-8A จากนั้นนำมาคำนวณ ดังสูตรคำนวณอัตราการหายใจดังนี้

อัตราการหายใจของผลเงาะ (มิลลิกรัม CO_2 ต่อกิโลกรัม.ชั่วโมง)

$$= \frac{(\%CO_2 \text{ from G.C.} - 0.033) \times (\text{ml.}) \times \frac{A}{B} \times \frac{C}{C+D}}{W \text{ (kg.)} \times \text{time (hr.)}}$$

เมื่อ V = ปริมาตรของอากาศภายในภาชนะ

W = น้ำหนักของผลเงาะ

A = น้ำหนักโมเลกุล CO_2 เท่ากับ 44

B = ปริมาตรของแก๊สที่ standard temperature and pressure เท่ากับ 22.4

C = อุณหภูมิมาตรฐานในหน่วยของเคลวิน (K) เท่ากับ 273

D = อุณหภูมิในขณะที่ทำการวัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3. การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

สกัดเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) จากเปลือกเงาะ ดัดแปลงจาก Huang *et al.* (1990) โดยชั่งน้ำหนักเปลือกเงาะประมาณ 1.5 กรัม บดในโกร่งและใช้สารละลายสกัด (extraction buffer) ซึ่งประกอบด้วย Polyvinyl Pyrrolidone (PVPP) 6.25 กรัม แขวนลอยใน 0.05 M KPi buffer pH 7 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เมื่อเข้ากันดีแล้ว นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ภายหลังการปั่น นำเฉพาะส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Montgomery and Sgarbiery (1975) นำเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนของสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีของ Montgomery and Sgarbiery (1975) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยปริมาณโปรตีนเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเนื้อเปลือกเงาะ

3.3.4. การวัดความแน่นเปลือกของผลเงาะ

วัดความแน่นเปลือกของผลเงาะด้วยเครื่อง Penetrometer โดยใช้หัวกดขนาด 0.61 เซนติเมตร กดลงบนเปลือกของผลเงาะ โดยกดลึก 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ครั้งต่อผล แปลงค่าความแน่นเปลือกที่ได้จากกิโลกรัมเป็นนิวตันโดยคูณด้วย 9.807 (Kader, 1982)

3.3.5 วิเคราะห์ผลการทดลองและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) จำนวน 5 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ผล ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย