บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. วัสดุพันธุ์พืช ผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 50 และ 70 มาจากแหล่งปลูกศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

2.1 เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (firmness tester) ของบริษัท Kiya Seisakusho รุ่น UB ขนาด 1 กก. หัววัดรูปทรงกระบอก (cylinder shape) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ยาว 10 มม.

2.2 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 อ่านค่าตั้งแต่ 0-32 องศาบริกซ์ (brix)

2.3 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่งของบริษัท Sartorious รุ่น BA 3100P และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่งของบริษัท Mettler Toledo รุ่น AB54

2.4 เครื่องปั่นผลไม้ (blender) ของบริษัท Moulinex รุ่น S(643)

2.5 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง ของบริษัท Hanna รุ่น HI 9021

2.6 เครื่องไตเตรท (Digital burette) ของบริษัท Brand

2.7 เครื่องกวนสารเคมีด้วยแท่งแม่เหล็กและให้ความร้อน ของบริษัท Nuova II

2.8 Water bath

2.9 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) ของบริษัท Beckman รุ่น DU 7500 และของบริษัท Hitachi รุ่น U 2001

2.10 กระดาษกรอง Whatman No.1

2.11 ตู้เย็น

2.12 มีดปอกผลไม้

2.13 กล้องถ่ายรูป

2.14 เวอร์เนีย (vernier caliper) ของบริษัท Japan micrometer

2.15 ตู้อบ (incubator)

2.16 เครื่องแก้ว

- บิกเกอร์
- ขวดรูปชมพู่ (enlenmeyer flask)
- volumetric flask
- กระบอกตวง
- บิวเรท
- ปิเปต
- กรวยกรอง
- แท่งแก้วคนสาร
- ช้อนตักสาร

2.17 สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, Merck) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid , Merck) เตรียมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
- 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck) เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ
- กรดแอสคอบิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอบิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ดูดมา 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทด้วย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์จนถึงจุดยุติ (สารละลายเป็นสีชมพู) แล้วบันทึกปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาล

- Carrze I เตรียมโดยชั่ง zinc dihydrate (Merck) มา 21.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดอะซีติก (glacial) 3 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- Carrze II เตรียมโดยชั่งโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Merck) มา 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- Fehling's solution No.1 เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$. $5H_2O$, Kanto) มา 69.278 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- Fehling's solution No.2 เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck) มา 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรต ($NaH_4KC_4O_6$. 4 H_2O, Merck) (Rochell salt) 346 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

Fehling's solution No.1 และ Fehling's solution No.2 ต้องเตรียมแยกกันและเก็บใส่ขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้ผสมสารละลายทั้งสองนี้ในปริมาตรเท่ากันทันทีก่อนใช้ (1:1)

- สารละลายเมทธิลีนบลู (Merck) เตรียมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งเมทธิลีนบลู 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck) เตรียมความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณแอนโธไซยานิน

- กรดไฮโดรคลอริก (Merck) เตรียมความเข้มข้น 1.5 นอร์มัล โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 62.10 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- เอทธาโนลิกไฮโดรคลอริก (เอทธานอล : กรดไฮโดรคลอริก) ใช้เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ : กรดไฮโดรคลอริก 1.5 นอร์มัล ในอัตราส่วน 85:15 โดยเติมเอทธานอลลงไปก่อน 100 มิลลิลิตร และตามด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1.5 นอร์มัล 150 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส)

สารเคมีที่ใช้หากิจกรรมของเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนส

- โพลีเอทธิลีนไกลคอล (polyetheleneglycol, PEG 4000) (Fluka) เตรียมความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งโพลีเอทธิลีนไกลคอล 120 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) (APS Finechem) เตรียมความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- โซเดียมอะซีเตต (sodium acetate) บัฟเฟอร์ pH 4.4 (Merck) เตรียมความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซีเตต 6.804 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1.5 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

-โซเดียมอะซีเตต (sodium acetate) บัฟเฟอร์ pH 5 (Merck) เตรียมความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซีเตต 6.804 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เท่ากับ 5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1.5 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) (Merck) เตรียมความเข้มข้น 0.5 โมลาร์โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 29.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- กรดโพลีกาแลคตูโรนิค (polygalacturonic acid) (Fluka) เตรียมความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งกรดโพลีกาแลคตูโรนิค 1.05 กรัม ละลายในโซเดียมอะซีเตต บัฟเฟอร์ pH 4.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร

- บอเรต (borate) บัฟเฟอร์ pH 9 (RIEDEL-DE HAENAC SEELZE-HANNOVER) เตรียมความเข้มข้น 0.1 โมลาร์โดยชั่งบอเรต 6.18 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- ไซยาโนอะซิทาไมด์ (cyanoacetamide) (Fluka) เตรียมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยชั่งไซยาโนอะซิทาไมด์ 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลสตรอเบอรี่ก่อนการเก็บเกี่ยว

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีปัจจัย คือ ระยะความแก่ของผลสตรอเบอรี่ คือ ผลสตรอเบอรี่ที่เก็บเกี่ยวทุก ๆ 3 วัน แต่ละวิธีการประกอบด้วย 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผลสตรอเบอรี่ 50 ผล

วิธีการทดลอง เก็บเกี่ยวผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 50 และ 70 ในระยะความแก่ต่าง ๆ จากแหล่งปลูกที่ตำบลบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ เก็บเกี่ยวเมื่อผลมีอายุ 10 วันหลังดอกบานเต็มที่จนถึงระยะเก็บเกี่ยวทางการค้า โดยเก็บเกี่ยวผลสตรอเบอรี่ทุก 3 วัน บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้แก่ รูปร่างผล สีผิว สีเนื้อ สีเมล็ด ตำแหน่งเมล็ด ความแน่นของแกนกลางผล และ ขนาดผล และวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ซึ่งได้แก่ ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ปริมาณวิตามินซี ปริมาณน้ำตาล และปริมาณแอนโธไซยานิน ตามวิธีดังนี้

1. **ลักษณะทางสัณฐานวิทยา**
   - บันทึกรูปร่างผล โดยการนับจำนวนผลที่มีรูปร่าง ดังนี้ กลมแบน, กลม, กลมปลายแหลม, กรวย, กรวยยาว, กรวยยาวมีคอ, ลิ่มยาว, ลิ่มสั้น
   - บันทึกขนาดผลตามความกว้าง ความยาว และความหนา มีหน่วยเป็นเซนติเมตร
   - บันทึกสีผิว โดยการสังเกตลักษณะสีผิว ดังนี้ ขาว, ชมพู, แดงสด, แดงเข้ม, แดงปนส้ม, ส้ม
   - บันทึกสีเนื้อ โดยการสังเกตลักษณะสีเนื้อ ดังนี้ ขาว, ชมพู, ส้ม, แดงอมส้ม, แดง, แดงเข้ม
   - บันทึกลักษณะเนื้อกลางผล (แกนกลาง) ผ่าครึ่งตามยาวแล้วสังเกตลักษณะเนื้อกลางผลดังนี้ แน่น, ปานกลาง, หลวม, กลวง
   - บันทึกสีของเมล็ดโดยการสังเกตลักษณะสีของเมล็ด ดังนี้ เขียว, เหลืองอมเขียว, เหลือง, ชมพู, ส้ม, แดง, น้ำตาล, ดำ
   - บันทึกตำแหน่งของเมล็ดโดยการสังเกตลักษณะตำแหน่งของเมล็ด ดังนี้ นูน, เสมอ, ต่ำ (จม)

2. การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลสตรอเบอรี่

2.1 เริ่มบันทึกหลังดอกบานเต็มที่ 10 วัน

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้น้ำของสตรอเบอรี่ที่ปั่นรวมกันมาหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่องมือ

ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

นำผลสตรอเบอรี่มาปั่นรวมกัน นาน 3 นาที แล้วนำของเหลวที่ได้หนัก 25 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 100 มล.แล้วจึงไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างจนสารละลายมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.2 แล้วจึงคำนวณหาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำหนักกรัมสมมูลย์ของกรดซิตริก คือ 0.070

โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{Tritrable acidity} = \text{normality of NaOH} \times \text{milliequi. wt. Of acid} \times \text{vol. NaOH} \times \frac{100}{25}$$

ปริมาณวิตามินซี

นำผลสตรอเบอรี่มาหาปริมาณวิตามินซีโดยวิธี indophenol โดยการนำของเหลวที่ปั่นได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาณของเหลวเท่ากับ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำสารละลายที่กรองได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดออกซาลิกให้ครบ 40 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์จนถึงจุดยุติ ซึ่งจะทำให้สารละลายมีสีชมพูประมาณ 15 วินาที แล้วคำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาณ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีลนอล ที่ใช้เทียบกับปริมาณ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้กับวิตามินซีมาตรฐาน

โดยคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณวิตามินซี} = \frac{a \times 0.001 \times 100 \times 1000}{b \times c}$$

a = ปริมาตร 2, 6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ในการไตเตรทกับสารตัวอย่าง

b = ปริมาตร 2, 6- ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ในการไตเตรทกับวิตามินซีมาตรฐาน

c = น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)

การหาปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลตามวิธีการของลักขณาและนิธิยา (2533) โดยชั่งน้ำปั่นสตรอเบอรี่มา 25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร

แล้วเติมสารละลาย Carrez I และ Carrez II อย่างละ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 500 มิลลิลิตร ตั้งสารละลายไว้จนกระทั่งตกตะกอน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำสารละลายมาไตเตรทหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง โดยนำสารละลายที่กรองได้ใส่ในบิวเรตชนิดปลายงอใช้สำหรับวิเคราะห์หาน้ำตาล ไล่ฟองอากาศให้ออกหมดโดยเฉพาะบริเวณที่ปลายแท่งงอ ดูดสารละลาย Fehling's reagent มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ glass balls 4-5 เม็ด และเมื่อสารละลาย Fehling's reagent เดือดจึงหยดเมทธิลีนบลู 1 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด แล้วไตเตรทสารละลาย Fehling's reagent ด้วยสารละลายตัวอย่าง บนตะเกียงบุนเซนขณะสารละลายเดือด ไตเตรทให้เสร็จภายในเวลา 3 นาที (ตั้งแต่สารละลายเริ่มเดือดจนสารละลายมีตะกอนสีส้มแดง) ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการไตเตรตหาปริมาณน้ำตาลต้องอยู่ในช่วง 15- 50 มิลลิลิตร แล้วทำซ้ำใหม่ 1 ครั้ง เพื่อให้ได้ปริมาตรที่แน่นอน บันทึกปริมาตรสารละลายที่ใช้ในการไตเตรท แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง จากตารางน้ำตาลอินเวอร์ตที่ใช้ Fehling's reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การหาปริมาณน้ำตาลนันรีดิวซิ่ง โดยการนำสารละลายตัวอย่างส่วนที่เหลือมา 70 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร แล้วทำให้สารละลายผสมมีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายมาแช่น้ำให้เย็น แล้วทำให้สารละลายเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสังเกตโดยกระดาษลิตมัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ปรับปริมาตรไปไตเตรทกับสารละลาย Fehling's reagent ตามวิธีหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลนันรีดิวซิ่ง

สูตรที่ใช้คำนวณคือ

เปอร์เซ็นต์น้ำตาลนันรีดิวซิ่ง = เปอร์เซ็นต์ของผลต่าง $(D_2-D_1) \times 0.95$

D_1 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลอินเวอร์ตก่อนทำการอินเวอร์ชั่น

D_2 = เปอร์เซ็นต์น้ำตาลอินเวอร์ตหลังทำการอินเวอร์ชั่น

ปริมาณแอนโธไซยานิน

หาปริมาณแอนโธไซยานินตามวิธีการของ Ranganna (1977) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

ผิวสตรอเบอรี่ 1 กรัม หั่นละเอียด

↓ เติม ethanolic HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

เปลี่ยนสารละลายทุก 3 ชั่วโมงจนผิวสตรอเบอรี่ไม่มีสี

↓ กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมารวมกัน

↓ ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย ethanolic HCl ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

↓

นำค่า absorbance ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดมีหน่วยเป็นมิลลิลิตร/100 กรัม น้ำหนักสด

สูตรที่ใช้คำนวณคือ

$$\text{Total Absorbance} = \frac{\text{Absorbance at 535 nm x final volume x 100}}{\text{Weight (gm)}}$$

$$\text{Total Anthocyanin content} = \frac{\text{Total Absorbance}}{98.2}$$

2.2 เริ่มบันทึกหลังดอกบานเต็มที่ 15 วัน

ความแน่นเนื้อ

หาความแน่นเนื้อโดยใช้เครื่องมือวัดความแน่นเนื้อผลไม้ ซึ่งมีส่วนหัวรูปร่างทรงกระบอกสำหรับแทงลงในเนื้อผลสตรอเบอรี่ ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวเท่ากับ 5 มิลลิเมตร และยาว 10 มิลลิเมตร โดยวัดบริเวณกลางผล ผลละ 1 ครั้ง ซึ่งใช้ผลสตรอเบอรี่ 5 ผล ต่อ 1 ซ้ำ

การทดลองที่ 2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนส

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยมีความแก่ของผลสตรอเบอรี่ที่เก็บเกี่ยวทุก ๆ 3 วันเป็นวิธีการแต่ละวิธีการมี 3 ซ้ำแต่ละซ้ำประกอบด้วยผลสตรอเบอรี่ 50 ผล

วิธีการทดลอง เก็บเกี่ยวผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 50 และ 70 ที่ระยะความแก่ต่าง ๆ จากแหล่งปลูกที่ตำบลบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอยู่ภายใต้การดูแลของศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ โดยเก็บเกี่ยวเมื่อผลมีอายุ 10 วันหลังดอกสตรอเบอรี่บานเต็มที่จนถึงระยะเก็บเกี่ยวทางการค้า โดยเก็บเกี่ยวผลสตรอเบอรี่ทุก 3 วัน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนส และความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ซึ่งวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธีการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression)

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนส

สกัดเอนไซม์โพลีกาแลคตูโรเนสจากผลสตรอเบอรี่ตามวิธีของ Zhou *et al.* (2000) โดยแช่เนื้อผลสตรอเบอรี่ปั่นในสารละลายที่มีโพลีเอทธิลีนไกลคอลที่มีมวลโมเลกุล 4000 (PEG 4000) 12% กับโซเดียมไบซัลไฟต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ความเร็วรอบ 5000 G ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บเนื้อสารไว้ นำเนื้อสารที่ได้มาแช่ในสารละลายผสมที่มีโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5 (50 mM) และโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M (เป็นสารละลายที่เย็น) วางไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5000 G ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บสารละลายที่เป็นส่วนใสไว้ นำสารละลายที่เป็นส่วนใสมาเจือจางด้วยโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 5 (50 mM) แล้วนำสารละลายที่ได้มาผสมกับสารสกัดเอนไซม์ (enzyme extract) ซึ่งประกอบด้วยกรดโพลีกาแลคตูโรนิก 0.5 % ที่ละลายอยู่ในโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.4 (50 mM) นำสารละลายที่ได้มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายมาเติมบอเรตบัฟเฟอร์ pH 9 (0.1M) 2 มิลลิลิตร และไซยาโนอะซิทาไมด์ 1% 0.3 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 274 นาโนเมตร