บทที่ 3
วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชทดลอง

ทำการห่อผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกด้วยถุงกระดาษเมื่อผลมีอายุได้ 75 วันหลังดอกบาน แล้วทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลที่มีอายุ 112 วันหลังดอกบานมาใช้ในการศึกษา

วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของการให้แสงต่อการพัฒนาสีผิวของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกหลังการเก็บเกี่ยว ฤดูการผลิต ปี พ.ศ. 2548 ทำการทดลองโดยใช้มะม่วงที่ไร่ประพัฒน์และบุตร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

การทดลองที่ 2 ผลของการให้แสงต่อการพัฒนาสีผิวของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกหลังการเก็บเกี่ยว ฤดูการผลิต ปีพ.ศ.2549 ทำการทดลองโดยใช้มะม่วงที่สวนคุณอุ่นเรือน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) นำผลมะม่วงมาแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย

ชุดที่ 1 ไม่ได้รับแสง (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2 ให้แสง ultraviolet (UV)

ชุดที่ 3 ให้แสง white light (WL)

ชุดที่ 4 ให้แสง ultraviolet ร่วมกับ white light (UV + WL)

โดยชุดที่ 1 นำไปเก็บไว้ในสภาพที่ไม่มีแสง ส่วนชุดที่ 2, 3 และ 4 นำไปให้แสงข้างต้นนาน 12 ชั่วโมง/วัน ผลมะม่วงทุกชุดอยู่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาการทดลองนาน 20 วัน ซึ่งในระหว่างการทดลองจะสุ่มนำผลออกมาตรวจวัดผล

แหล่งกำเนิดแสง UV ที่ใช้เป็นหลอด UV ยี่ห้อ NARVA ขนาด 18 วัตต์ มีความเข้มแสงเฉลี่ยเท่ากับ 1093 ft.candle ทำการวัดปริมาณ UV โดยเครื่อง UV-radiometer รุ่น UM-1 ยี่ห้อ Minolta

ในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณ UV เฉลี่ยเท่ากับ 0.0109 mW/cm^2

ในปี พ.ศ. 2549 มีปริมาณ UV เฉลี่ยเท่ากับ 0.0112 mW/cm^2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แหล่งกำเนิดแสง WL ที่ใช้เป็นหลอด WL ยี่ห้อไดอิจิ ขนาด 18 วัตต์ มีความเข้มแสงเฉลี่ยเท่ากับ 177 ft.candle และเมื่อใช้ร่วมกับหลอด UV จะมีปริมาณ ดังนี้

ในปี พ.ศ. 2548 มีปริมาณ UV เฉลี่ยเท่ากับ 0.0054 mW/cm^2

ในปี พ.ศ. 2549 มีปริมาณ UV เฉลี่ยเท่ากับ 0.00523 mW/cm^2

การทดลองที่ 1 และ 2 ทำการศึกษาเช่นเดียวกันเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองและศึกษาผลของการตอบสนองของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกจาก 2 แหล่งผลิต

การตรวจวัดผลการทดลอง นำผลมะม่วงแต่ละชุดออกมาตรวจวัดผลระหว่างทดลองเป็นเวลา 3, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยวัดผลต่างๆดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก

ทำการวัดสีเปลือกและสีเนื้อโดยใช้เครื่อง chroma meter (ยี่ห้อ Minolta CR 200) ทำการวัดสีที่ตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ หัว กลาง และ ท้าย แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยโดยค่าที่ได้จากการวัดเป็นค่า L*, a* และ b*

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

เมื่อ L* เป็นค่าความสว่าง ถ้าค่า L มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีทึบ ถ้าค่า L เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีสว่าง

a* เป็นค่าที่แสดงถึงสีแดงและสีเขียว ถ้าค่า a เป็นบวก (+) วัตถุมีสีแดง แต่ถ้า a เป็นลบ (-) วัตถุมีสีเขียว

b* เป็นค่าที่แสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้า b เป็นบวก (+) วัตถุมีสีเหลือง แต่ถ้าค่า b เป็นลบ (-) วัตถุมีสีน้ำเงิน

โดย a* และ b* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60

2. การเปลี่ยนแปลงของสารสีที่เปลือกผล

2.1การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

การสกัดและหาปริมาณคลอโรฟิลล์ ดัดแปลงจากวิธีของ Witham *et al.* (1986) โดยชั่งเปลือกผลมะม่วงจำนวน 2 กรัม มาบดในโกร่งและขณะบดให้เติมอะซิโตน ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปเล็กน้อย เมื่อบดจนละเอียดแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

No. 1) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตน ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ยี่ห้อ Milton Roy Comrany รุ่น Spectronic 21) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้อะซิโตน ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank บันทึกค่าที่ได้ แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณจากสูตร โดยมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ} = \frac{(12.7*OD663 - 2.69*OD645) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี} = \frac{(22.9*OD645 - 4.68*OD663) \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = \frac{(20.2*OD645 + 8.02*OD663) \times V}{1000 \times W}$$

โดยที่ OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่อง spectrophotometer ตามความยาวคลื่นที่กำหนด

V คือ ปริมาณของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของเปลือกผลมะม่วงที่นำมาสกัดหาคลอโรฟิลล์

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณเบตา-คาโรทีน

การสกัดและหาปริมาณเบตา-คาโรทีน โดยวิธีของ Davies (1976) โดยชั่งเปลือกผลมะม่วงหนัก 5 กรัม ใส่ในโกร่งแล้วเติมเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงไปและทำการบดให้ละเอียด นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 แล้วล้างส่วนที่ค้างอยู่ด้วยอะซิโตน 40 มิลลิลิตร เทสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดลงในกรวยแยก (separatory funnel) แล้วเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไป 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วเติมน้ำกลั่นเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนมองเห็นสารละลายแยกชั้นอย่างชัดเจน แยกสารละลายส่วนล่างเก็บไว้ ส่วนสารละลายชั้นบนให้ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนได้สารละลายสีเหลือง แยกสารละลายสีเหลืองเก็บไว้ นำสารละลายที่เก็บไว้ครั้งแรกมาเติมด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แยกสารละลายส่วนล่างทิ้งไปและเก็บสารละลายส่วนบนสีเหลืองรวมกับสารละลายสีเหลืองที่เก็บไว้ครั้งแรกลงในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) แล้วเติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อิ่มตัวในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1ใน 4 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ห่อขวดชมพู่ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ให้มิดชิดแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทใส่กรวยแยก เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที แล้วเติมน้ำกลั่นเล็กน้อย เขย่าอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ จนสารละลายแยกชั้นกันอย่างชัดเจนแล้วเติมผงโซเดียมซัลเฟต ลงไป 2.5 กรัม นำไปเก็บในตู้เย็นอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงนำออกมาวัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมด และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนโมล โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็น blank นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณเบตา-คาโรทีน ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด จากสูตร

$$\text{ปริมาณเบตา-คาโรทีน} = \frac{V\ A_{450} \times 1000}{W \times 2500}$$

โดยที่ V = ปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมด (มิลลิลิตร)

A_{450} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่อ่านได้

W = น้ำหนักของเปลือกผลมะม่วงที่ใช้

2500 = ค่า $E^{1\%}_{1hr}$ (สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง) ของเบตา-คาโรทีน

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

การสกัดและหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยใช้ estimation of total anthocyanin method (Ranganna ,1977) โดยนำเปลือกผลหนัก 2.5 กรัม มาหั่นซอยให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วแช่ในสารละลาย ethanolic HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 และปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย ethanolic HCl จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance (OD) ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ ethanolic HCl เป็น blank นำค่า OD ที่อ่านได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{OD at 535 nm} \times \text{final volume} \times 100}{\text{weight (g)}}$$

$$\text{Total anthocyanin} = \frac{\text{total absorbance}}{98.2}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเปลี่ยนแปลงแอคทิวิตีของเอนไซม์ PAL

การสกัดและวิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์ PAL ดัดแปลงจากวิธีการของ Faragher and Chalmers (1977) และ Arakawa *et al.*, (1986)) โดยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 การสกัดเอนไซม์ PAL

ทำการสกัดเอนไซม์ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก 5 กรัมด้วยสารละลายสกัดปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M borate buffer (pH 8.8), 14 mM mercaptoethanol 10% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) แล้วนำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated high speed centrifuge (ยี่ห้อ Hermle รุ่น Z 383 K) ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีภายหลังการปั่นเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลว (supernatant) ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที และนำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์แอคทิวิตีของเอนไซม์ PAL ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ PAL

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 40 mM phenylalanine 1 มิลลิลิตร และ 0.1 M borate buffer (pH 7) 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองที่มีสารละลายดังกล่าว (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแทน crude enzyme) ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 4 มิลลิลิตร วางหลอดทดลองใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2 N perchloric acid 1 มิลลิลิตรลงไปในหลอดทดลองแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย refrigerated high speed centrifuge ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ภายหลังการปั่นเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลว (supernatant) ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (ยี่ห้อ Lambda 25 Spectrometer) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ cinnamic acid (ภาพภาคผนวก 1)

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเจือจาง crude enzyme ลง 100 เท่า นำ crude enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มี alkaline copper solution 2.5 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ประกอบด้วย 4% Na_2CO_3 : 0.2 N NaOH : 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 2% potassium tartrate ในอัตราส่วน 5 : 5 : 0.1 : 0.1) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ต่อจากนั้นเติม 50% phenol-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

reagent 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนี้แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปวัดหาค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาพภาคผนวก 2) ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ 1 กรัม น้ำหนักสด โดยใช้สูตร ดังนี้

ปริมาณโปรตีน $= 0.4\,Y$

เมื่อ Y ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3.4 นำค่าที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2 และ 3.3 มาคำนวณค่าแอคทิวิตีเอนไซม์ PAL ซึ่งมีหน่วยเป็น นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน•ชั่วโมง (n mole / mg protein •hr)

4. การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้และการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ไทเทรตได้

4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ; TSS)

วัดปริมาณ TSS โดยใช้เครื่อง digital refractometer (ยี่ห้อ ATATO รุ่น PAL-1) โดยก่อนที่จะทำการวัดให้ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวปรับค่าให้เป็นศูนย์ แล้วเช็ดน้ำกลั่นออก จากนั้นหยดน้ำคั้นที่ได้จากเนื้อผลมะม่วงลงบนเครื่องมือแล้วอ่านค่าที่ได้มีหน่วยเป็น % Brix

4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity ; TA)

นำน้ำคั้นจากเนื้อผลมะม่วงปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน NaOH (0.1N) โดยใช้เครื่อง Autotitrater (ยี่ห้อ Schott รุ่น Titroline easy M2-230V) ซึ่งตั้งจุดยุติ (end point) อยู่ที่ pH 8.1 นำค่าสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ได้มาคำนวณปริมาณกรดที่ไทเทรตได้โดยเทียบกับกรดซิตริกจากสูตร

$$\%TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (N)} \times \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (ml)} \times 0.064^{*} \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นของมะม่วง (ml)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 อัตราส่วน TSS:TA

คำนวณหาค่าอัตราส่วนโดยนำผลลัพธ์ในข้อ 4.1 หารด้วยผลลัพธ์ในข้อ 4.2

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. ไร่ประพัฒน์และบุตร และสวนคุณอุ่นเรือน อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินงานทดลอง

ตั้งแต่ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2548 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved