บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง Spectrophotometer ของ Miton Roy Company model Spectronic 21
2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิของน้ำ (Hot Water Bath) ของ GALLENKAMP
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand Refractometer ของ ATAGO)
4. เครื่องวัดสี (Hunter's Colorimeter model CR-200 ของ Minolta)
5. เครื่องไตเตรท ยี่ห้อ Brinkman Digital Buret
6. เครื่องชั่งไฟฟ้า (Mettler BB2400)
7. ถุงพลาสติก Polyethylene (PE) ขนาดกว้าง 23 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร หนา 0.039 มิลลิเมตร
8. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. กล้องถ่ายภาพ

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาคลอโรฟิลล์
   - acetone 80%
2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาวิตามินซี
   - 2, 6-dichloroindophenol
   - metaphosphoric acid (HPO_3)
   - ascorbic acid
   - acetic acid
3. สารเคมีที่ใช้เตรียมสารเคลือบผิว
   - chitosan
   - acetic acid 0.50%
   - sodium hydroxide 1 N
4. sodium chloride (NaCl)

การเตรียมพืชทดลอง

คัดเลือกผลมะนาวไทยพันธุ์แป้นที่เก็บจากต้นใหม่ๆ ไม่มีบาดแผล ไม่มีโรคและแมลง ผลมีสีเขียวสดไม่มีสีเหลืองปน ล้างทำความสะอาดผลด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งก่อนนำไปทดลอง

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำร้อนและเวลาแช่ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาผลมะนาว ตอนที่ 2 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลมะนาว ตอนที่ 3 ศึกษาผลของไคโตแซนที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลมะนาว

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของอุณหภูมิของน้ำร้อน และเวลาแช่ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาผลมะนาวไทย พันธุ์ แป้น

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิของน้ำร้อนมี 3 ระดับ คือ 49, 52 และ 55°ซ และปัจจัยที่ 2 เวลาที่ใช้ในการแช่มี 2 ระดับ คือ 5 และ 10 นาที รวมมี 6 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำร้อน 49°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำร้อน 49°ซ เป็นเวลา 10 นาที
กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำร้อน 52°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำร้อน 52°ซ เป็นเวลา 10 นาที
กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำร้อน 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 6 แช่น้ำร้อน 55°ซ เป็นเวลา 10 นาที

2. นำผลมะนาวแบ่งออกเป็น 6 ชุดการทดลองๆ ละ 235 ผล แล้วนำไปผ่านตามกรรมวิธีที่ 1-6 โดยแต่ละกรรมวิธีจะแบ่งผลมะนาวออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 20 ผล วัดค่าสี L*, a*, b*

และการสูญเสียน้ำหนัก กลุ่มที่ 2 จำนวน 20 ผล ประเมินการเกิดโรค กลุ่มที่ 3 จำนวน 195 ผล นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และประเมินคุณภาพผลด้วยประสาทสัมผัส

3. นำผลมะนาวในข้อ 2 ไปบรรจุถุง polyethylene (PE) ขนาดกว้าง 23 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร หนา 0.039 มิลลิเมตร ที่เจาะรูซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.90 เซนติเมตร จำนวน 6 รู คิดเป็นพื้นที่รู 0.54% ของพื้นที่ถุงทั้งหมด มัดปากถุง เก็บไว้ที่ 25°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70% และ 13 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90%

4. การวัดและตรวจสอบคุณภาพของผลมะนาว

4.1 การวิเคราะห์ทางกายภาพจะใช้มะนาวกลุ่มที่ 1, 2 ของแต่ละกรรมวิธีโดยทำเครื่องหมาย วงกลมกำกับหมายเลข (1-20) บริเวณกึ่งกลางผล (ภาพ 4) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ดังนี้

ภาพ 4 การทำเครื่องหมายวงกลมกำกับหมายเลข 1-20 บริเวณกึ่งกลางผลมะนาว

4.1.1. การสูญเสียน้ำหนัก วัดการสูญเสียน้ำหนักทุก 10 วัน โดยการชั่งน้ำหนักผลมะนาวกลุ่มที่ 1 ของแต่ละกรรมวิธี แล้วคิดหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนัก ณ วันที่ตรวจผล})}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

4.1.2. การเกิดโรค และอาการผิดปกติของผลมะนาว

การเกิดโรคของผลมะนาว พิจารณาจากการปรากฏของเส้นใยของเชื้อราที่สามารถสังเกตุเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพ 5) โดยผลที่ลูกศรชี้จะนับเป็นผลที่เป็นโรค นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากสูตร

$$\% \text{ การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

ภาพ 5 ผลมะนาวที่เป็นโรคและมีเส้นใยของเชื้อราเกิดขึ้น

อาการผิดปกติของผล พิจารณาจากสภาพสีผิวของผลมะนาวที่ผิดปกติไป เช่น มีสีน้ำตาลคล้ำ หรือ สีน้ำตาล เกิดขึ้น (ภาพ 6A และ B) นับจำนวนผลที่แสดงอาการผิดปกติแล้ว คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลที่ผิดปกติจากจำนวนผลทั้งหมด

(A) (B)

ภาพ 6 อาการผิดปกติของผลมะนาวที่ผิวผลมีสีน้ำตาลคล้ำ (A) และมีสีน้ำตาล (B)

4.1.3. การเปลี่ยนแปลงของสีผิว วัดสีผิวผลมะนาวกลุ่มที่ 1 ของแต่ละกรรมวิธีโดยใช้เครื่อง chroma meter (Minolta CR-200) ทำการวัดสีเปลือกบริเวณกึ่งกลางผล โดยวัดตำแหน่งเดิมทุก 10 วัน ค่าที่ได้จากการวัดแสดงเป็นค่า L*, a*, b*,C* และ h° (Donald, 1992)

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

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

C* = chroma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$)

h° = hue angle (h° = arctangent b*/a*)

เมื่อ L* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำหากค่า L* เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง

a* มีค่าเป็นบวกหมายถึง วัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีเขียว

b* มีค่าเป็นบวกหมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็น 0 หมายถึง วัตถุมีสีเทา

C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากมีค่าสูงเข้าใกล้ 60 วัตถุมีสีเข้ม

h° มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

4.2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีจะใช้มะนาวกลุ่มที่ 3 ของแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 15 ผล เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีแบบทำลายผล ตลอดการเก็บรักษา ดังนี้

4.2.1. การสกัดและหาปริมาณคลอโรฟิลล์ตามวิธีของ Arnon (1949) โดยนำเปลือกมะนาวหั่นฝอย 1 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีบดในอะซิโตน 80% ปริมาตร 5 มล กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนให้ได้ 20 มล นำไปวัดค่า absorbance (OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 21 โดยใช้อะซิโตน 80% เป็น blank นำค่า OD ที่อ่านได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ คลอโรฟิลล์-บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด มีหน่วยเป็น มล/100 กรัมน้ำหนักสด จากสูตร

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์-เอ} = (12.7D_{663} - 2.69D_{645}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์-บี} = (22.9D_{645} - 4.68D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด} = (20.2D_{645} + 8.02D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

โดย D_{663} = O.D. ที่ความยาวคลื่น 633 nm

D_{645} = O.D. ที่ความยาวคลื่น 645 nm

V = ปริมาตรอะซิโตนที่ใช้ (20 มล)

W = น้ำหนักผิวเปลือกมะนาว (1 กรัม)

4.2.2. การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS) โดยใช้ hand refractometer (ATAGO model ATC 1) โดยก่อนที่จะทำการวัด TSS ให้ใช้น้ำกลั่นปรับสเกลให้เป็นศูนย์ แล้วเช็ดน้ำกลั่นออก จากนั้นหยดน้ำคั้นที่ได้จากมะนาวแต่ละกรรมวิธีลงบน hand refractometer อ่านค่าที่ได้เป็น %

4.2.3. การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ตามวิธีของ Pearson (1971) โดยนำน้ำคั้นจากผลมะนาว 2 มล ไตเตรทกับสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (0.1 N) โดยใช้สารละลาย phenolphthalein 1% เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อสารละลายมีสีชมพูเกิดขึ้นถือว่าถึงจุดยุติ (end point) นำค่าของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาณกรด โดยเทียบกับกรดซิตริคได้จากสูตร

$$\% \text{ TA} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1N) x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (มล) x 0.064* x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นมะนาว (มล)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

4.3. การประเมินคุณภาพผลด้วยประสาทสัมผัส โดยการใช้ผู้ประเมินที่ฝึกแล้วจำนวน 5 คน ตลอดการทดลองเพื่อประเมินคุณภาพผลด้วยประสาทสัมผัส ดังนี้

4.3.1. การเปลี่ยนแปลงสีผิว โดยนำผลมะนาวในกลุ่มที่ 1 ของแต่ละกรรมวิธีจัดวางในถาดแล้วให้ผู้ประเมินให้คะแนนสีผิวโดยดูภาพ 7 ประกอบการให้คะแนนของผลที่ 1-20 ตลอดการเก็บรักษา ดังนี้

ภาพ 7 ภาพประกอบการให้คะแนนสีผิวของผลมะนาว

5 = สีเขียว

4 = เขียวออกเหลือง

3 = เหลืองออกเขียว

2 = เหลือง

1 = น้ำตาล (เน่า)

4.3.2. คุณภาพด้านรสชาติ โดยคั้นน้ำมะนาวออกมา แล้วให้ผู้ประเมินชิมและให้คะแนน ดังนี้

4 = ปกติ

3 = ผิดปกติเล็กน้อย

2 = ผิดปกติปานกลาง

1 = ผิดปกติมาก

4.3.3. คุณภาพด้านกลิ่น นำน้ำมะนาวมาให้ผู้ประเมินดมกลิ่นและให้คะแนน ดังนี้

3 = กลิ่นมะนาว

2 = ไม่มีกลิ่นมะนาว

1 = กลิ่นผิดปกติ

4.3.4 คุณภาพการยอมรับโดยรวม โดยให้ผู้ประเมินพิจารณาคุณภาพผลในข้อ 4.3.1 ถึงข้อ 4.3.3 แล้วให้คะแนน ดังนี้

6 = คุณภาพดีเยี่ยม

5 = คุณภาพดี

4 = คุณภาพพอใช้

3 = คุณภาพไม่ดี ไม่สามารถวางตลาดได้

2 = คุณภาพไม่ดี แต่ยังพอรับประทานได้

1 = คุณภาพไม่ดี รับประทานไม่ได้

4.4 อายุการเก็บรักษาของผลมะนาว พิจารณาจากข้อมูลที่ตรวจวัดข้างต้นและตั้งเกณฑ์การตัดสินอายุการเก็บรักษาของผลมะนาว ดังนี้

- ผลสูญเสียน้ำหนักไม่เกิน 10% ของน้ำหนักผล
- ผลมีคะแนนสีผิวไม่น้อยกว่า 2 คะแนน
- ผลมีคะแนนการยอมรับคุณภาพโดยรวมของผลไม่น้อยกว่า 4 คะแนน
- ผลมีความเสียหายจากโรคและอาการผิดปกติอื่นๆ ไม่เกิน 20% ของจำนวนผลทั้งหมด

จากเกณฑ์ข้างต้นการตัดสินการสิ้นอายุการเก็บรักษาของผลมะนาวอาจใช้เกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งหรือหลายๆ เกณฑ์ร่วมกัน

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลมะนาว

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในตอนที่ 1 อุณหภูมิของน้ำร้อนและระยะเวลาแช่ที่เหมาะสมกับมะนาวไทยพันธุ์แป้นที่ดีที่สุดคือ น้ำร้อน 55°ซ แช่นาน 5 นาที สามารถชะลอการเกิดอาการผิดปกติ และยืดอายุการเก็บรักษาได้นาน 60 วัน ดังนั้น ในการศึกษาตอนที่ 2 จึงนำผลการทดลองที่ดีที่สุดของตอนที่ 1 มาศึกษาต่อโดยเติมสารโซเดียมคลอไรด์ลงในน้ำร้อน 55°ซ

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรม คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำร้อน 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที (ชุดควบคุม)
กรรมวิธีที่ 2 แช่ NaCl เข้มข้น 0.25% W/V ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 3 แช่ NaCl เข้มข้น 0.50% W/V ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4 แช่ NaCl เข้มข้น 1.00% W/V ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 5 แช่ NaCl เข้มข้น 1.50% W/V ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที

2. นำผลมะนาวแบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองๆ ละ 295 ผล แล้วนำไปผ่านตามกรรมวิธีที่ 1–5 แล้วนำผลมะนาวไปบรรจุถุง polyethylene (PE) เจาะรู มัดปากถุง เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 เก็บรักษาไว้ที่ 25°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70% และ 13°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90%

3. การวัดและตรวจสอบคุณภาพของผลมะนาว ทำเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของไคโตแซนที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาผลมะนาว

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในตอนที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมกับผลมะนาวคือ สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.50% ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที เนื่องจากสามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงของสีผิว การสูญเสียน้ำหนัก และควบคุมโรคได้นาน 70 วัน ในการศึกษาตอนที่ 3 จึงนำผลการทดลองที่ดีที่สุดของตอนที่ 2 มาศึกษาต่อโดยใช้สารเคลือบผิวไคโตแซน

วิธีการวิจัย

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่ NaCl เข้มข้น 0.50% W/V ที่ 55°ซ 5 นาที ไม่เคลือบผิว (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 แช่ NaCl เข้มข้น 0.50% W/V ที่ 55°ซ 5 นาที แล้วเคลือบผิวด้วยไคโตแซนเข้มข้น 0.10% W/V

กรรมวิธีที่ 3 แช่ NaCl เข้มข้น 0.50% W/Vที่ 55°ซ 5 นาที แล้วเคลือบผิวด้วยไคโตแซนเข้มข้น 0.25% W/V

กรรมวิธีที่ 4 แช่ NaCl เข้มข้น 0.50% W/V ที่ 55°ซ 5 นาที แล้วเคลือบผิวด้วยไคโตแซนเข้มข้น 0.50% W/V

2. นำผลมะนาวแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 355 ผล นำผลมะนาวไปแช่ในสารละลาย NaCl เข้มข้น 0.50% W/V ที่ 55°ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลมาปล่อยไว้ให้แห้ง จากนั้นจึงนำไปเคลือบผิวด้วยไคโตแซน

3. การเตรียมสารเคลือบผิว นำสารไคโตแซนชนิด high molecular weight chitosan ไปละลายในกรดอะซิติค 0.50% ที่ปรับ pH ให้ได้ 5.6 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 N (El-Ghaouth *et al.*, 1992) โดยเตรียมให้ได้สารไคโตแซนเข้มข้น 0.10, 0.25 และ 0.50% W/V และชุดควบคุม แช่ในสารละลายกรดอะซิติค 0.50% pH 5.6

4. นำผลมะนาวทั้ง 4 ชุดการทดลองไปเคลือบด้วยสารเคลือบผิวที่ได้จากข้อ 3 แล้วผึ่งผลมะนาวให้แห้ง บรรจุถุง polyethylene (PE) เจาะรู มัดปากถุง เช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 เก็บไว้ที่ 25°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 70% และ 13°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90%

5. การวัดและตรวจสอบคุณภาพของผลมะนาว ทำเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 แต่ตรวจวัดปริมาณวิตามินซี ตามวิธีของ AOAC (1995) โดยใช้น้ำคั้นมะนาว 2 มล + metaphosphoric acetic acid 5 มล (เตรียมได้จาก metaphosphoric acid 15 กรัม ละลายในกรด acetic 40 มล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มล) ไตเตรทกับ 2, 6–dichloroindophenol จนได้สารละลายที่ไม่มีสี เมื่อทำปฏิกิริยากันจนหมด 2, 6–dichloroindophenol ที่เหลือจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูในสภาพที่เป็นกรดแสดงว่าถึงจุดยุติ (end point) นำปริมาณสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยามาคำนวณหาปริมาณวิตามินซีเป็นมิลลิกรัม/100 กรัม จากสูตร

$$\text{ปริมาณวิตามินซี} = [\, X - B * (F/E) * (V/Y) \,] * 100$$

โดย X = ปริมาตรเฉลี่ยของ dye solution ที่ใช้ไตเตรทกับน้ำมะนาว (มล)

B = ปริมาตรเฉลี่ยของ dye solution ที่ไตเตรทกับ blank

F = mg equivalent ascorbic acid (anhydrous) = 0.093

E = ปริมาตรของน้ำมะนาวก่อนการวิเคราะห์ (2 มล)

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ (7 มล)

Y = ปริมาตรของสารตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาไตเตรท (7 มล)