บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องควบคุมอุณหภูมิของน้ำ (water bath ของ GEL 1083)
2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer ของ ATAGO)
3. เครื่องวัดสี (Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta)
4. เครื่องไตเตรต ยี่ห้อ Brinkman Digital Buret
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. เทอร์โมมิเตอร์
7. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Metex Hunter Spring model LKG-10 1 kg/div.)
8. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
9. กล้องจุลทรรศน์
10. Haemacytometer
11. ไคโตซานจากเปลือกกุ้งชนิดเกล็ด
    (chitosan flake ของ บริษัท ต้าหมิงเอนเตอร์ไพรซ์ จำกัด)
12. สารละลายกรดอะซิติก
13. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ malt yeast agar (MYA)
15. Tween 80

การเตรียมพืชทดลอง

ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่ใช้ในการทดลอง ได้จากสวนบ้านทราย อ. เมือง จ.ลำปาง โดยเก็บผลมะม่วงที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 150 วันหลังดอกบานเต็มที่ ไม่มีบาดแผล ไม่มีโรคและแมลง หลังเก็บเกี่ยวเด็ดก้านผลออกเพื่อให้ยางไหลและทำความสะอาดด้วยน้ำประปาที่เป็นน้ำไหลและมีการหมุนเวียน ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปทดลอง

การเตรียมสารเคลือบผิว

นำไคโตซานจากกุ้งชนิดเกล็ด (ผลิตโดย บริษัท ต้าหมิงเอนเตอร์ไพรซ์ จำกัด) 20 กรัม ใส่ลงในน้ำสะอาด ปริมาตร 990 มิลลิลิตร แล้วคนผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Glacial acetic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป และคนทุก ๆ 1 – 2 ชั่วโมง จนเกล็ดไคโตซาน

ละลายหมด จะได้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ ลดความเข้มข้นเพื่อใช้ในการทดลองด้วยน้ำสะอาด ให้ได้ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองเป็น 3 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเคลือบผิวผลมะม่วง ตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนส ตอนที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำร้อนและเวลาในการแช่ผลมะม่วงร่วมกับการเคลือบผิวด้วยไคโตซานต่อคุณภาพผลและการเกิดโรค แอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

ตอนที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเคลือบผิวผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยเคลือบผิวผลมะม่วงด้วยการจุ่มผลลงในสารละลายไคโตซานนาน 10 วินาที ซึ่งสารละลายไคโตซานที่ใช้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.25 % W/V

กรรมวิธีที่ 3 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.50 % W/V

กรรมวิธีที่ 4 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.75 % W/V

กรรมวิธีที่ 5 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.00 % W/V

ในแต่ละกรรมวิธีมีผลมะม่วง 55 ผล แบ่งผลมะม่วงออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ผล นำไปตรวจวัด การสูญเสียน้ำหนัก การประเมินการเกิดโรค และการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก กลุ่มที่ 2 จำนวน 50 ผล นำไปตรวจวัด การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อ การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (TA) และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

เก็บรักษาผลมะม่วงที่ผ่านวิธีการต่างๆ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29±2 ^{o}ซ, 80±3 %RH) วิเคราะห์คุณภาพทุกวัน โดยกลุ่มที่ 1 ตรวจวัด 5 ผลตลอดการทดลอง และกลุ่มที่ 2 ตรวจวัด วันละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล รวม 10 ครั้ง

ตรวจวัดคุณภาพผลมะม่วงและบันทึกผลการทดลอง ดังนี้

1. การสูญเสียน้ำหนัก

วัดการสูญเสียน้ำหนักโดยชั่งน้ำหนักผล แล้วนำไปคิดเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \left(\frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนัก ณ วันที่ตรวจผล}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}\right) \times 100$$

2. การประเมินการเกิดโรค

โดยประเมินจากพื้นที่เกิดโรค แล้วให้ระดับคะแนนอัตราการเกิดโรค 5 ระดับ

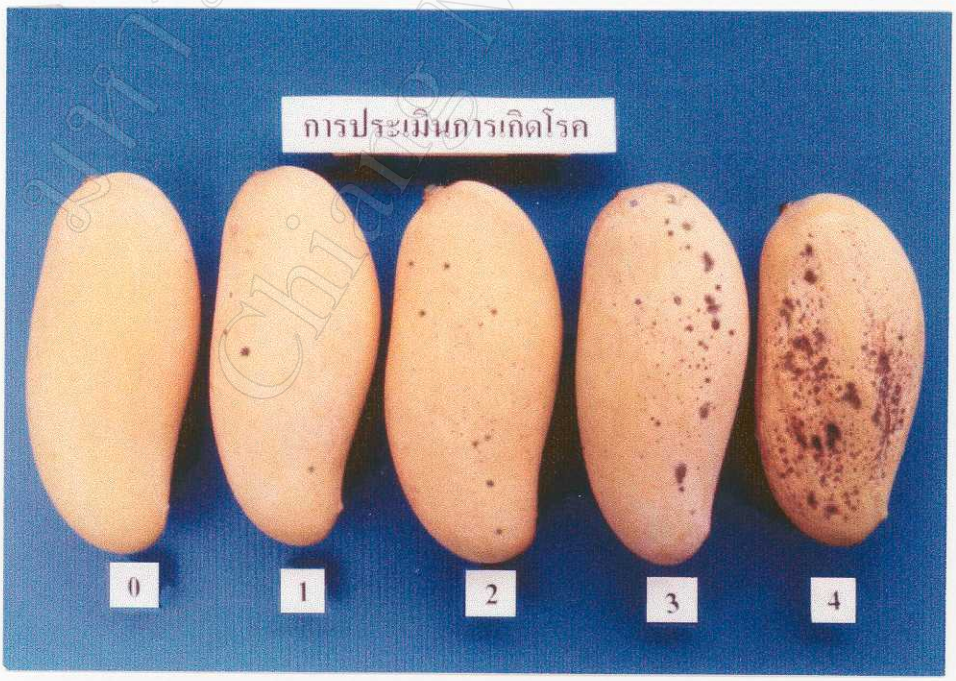
0 = ผลมะม่วงมีความสมบูรณ์ ไม่เกิดโรค

1 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวเปลือก (ไม่มีผลต่อการซื้อขาย)

2 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวเปลือก (มีผลต่อการซื้อขาย)

3 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวเปลือก (มีผลต่อการซื้อขาย)

4 = มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวเปลือก (ขายไม่ได้)



ภาพที่ 2 การประเมินการเกิดโรค

3. การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกและสีเนื้อ

วัดสีเปลือกด้วยเครื่องวัดสี chroma meter (Minolta CR-200) โดยทำเครื่องหมายวงกลมทั้งสองข้างของผิวผลและวัดสีบริเวณดังกล่าวทุกครั้งที่ตรวจผล วัดสีเนื้อโดยเฉือนผลมะม่วงให้เรียบและใกล้เมล็ดที่สุด แล้ววัดสีเนื้อบนด้านที่ไม่มีเมล็ดติดอยู่ ค่าที่ได้จะแสดงออกมาเป็นค่า L* , a* , b* และ h^{o}

L* = The lightness factor (value)

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

h^{o} = hue angle (h^{o} = arctangent b*/ a*)

เมื่อ L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีสว่าง

ค่า a* เมื่อมีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีเขียว หากเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีแดง ยิ่งค่า a* มีค่าต่ำมากแสดงว่าผลิตผลมีสีเขียวมาก (โดยค่า a* มีค่าอยู่ในช่วง –60 ถึง +60)

ค่า b* มีค่าเป็นลบหมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน หากเป็นบวกหมายถึงวัตถุมีสีเหลือง ยิ่งค่า b* มีค่าสูงมากแสดงว่าผลิตผลมีสีเหลืองมาก (โดยค่า b* มีค่าอยู่ในช่วง –60 ถึง +60)

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็น 0 หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า h^{o} มีค่าเข้าใกล้มุม 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง (+b) หากมีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว (-a)

4. การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ

วัดความแน่นเนื้อด้วยเครื่อง firmness tester (Metex Hunter Spring model LKG-10 1 kg/div.) หัวเจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร สำหรับผลมะม่วงดิบ และหัวเจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร สำหรับผลมะม่วงสุก โดยใช้มีด 2 คม ปอกเปลือกมะม่วงให้ความหนาของเปลือกคงที่ประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ทั้ง 2 ด้านของแก้มผล แล้วกดหัวเจาะลงในเนื้อผล นำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็น กิโลกรัม / ตารางเซนติเมตร

5. การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids, TSS)

โดยวัดจากน้ำคั้นมะม่วงด้วยเครื่อง hand refractometer (ATAGO) อ่านค่าที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์

6. การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (titratable acidity, TA)

โดยไตเตรตน้ำคั้นมะม่วงปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (0.1N) และใช้สารละลาย phenophthalein 1 เปอร์เซ็นต์เป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติ (end point) เกิดเมื่อ

สารละลายมีสีชมพู นำค่าของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH ที่ใช้มาคำนวณหาปริมาณกรด เทียบกับกรดซิตริคได้จากสูตร

$$\% \text{ TA} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1N) x ปริมาตรของที่ใช้ (ml) x 0.064* x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นมะม่วง (ml)}}$$

* milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064 (Pearson, 1971)

7. อัตราส่วน TSS/TA

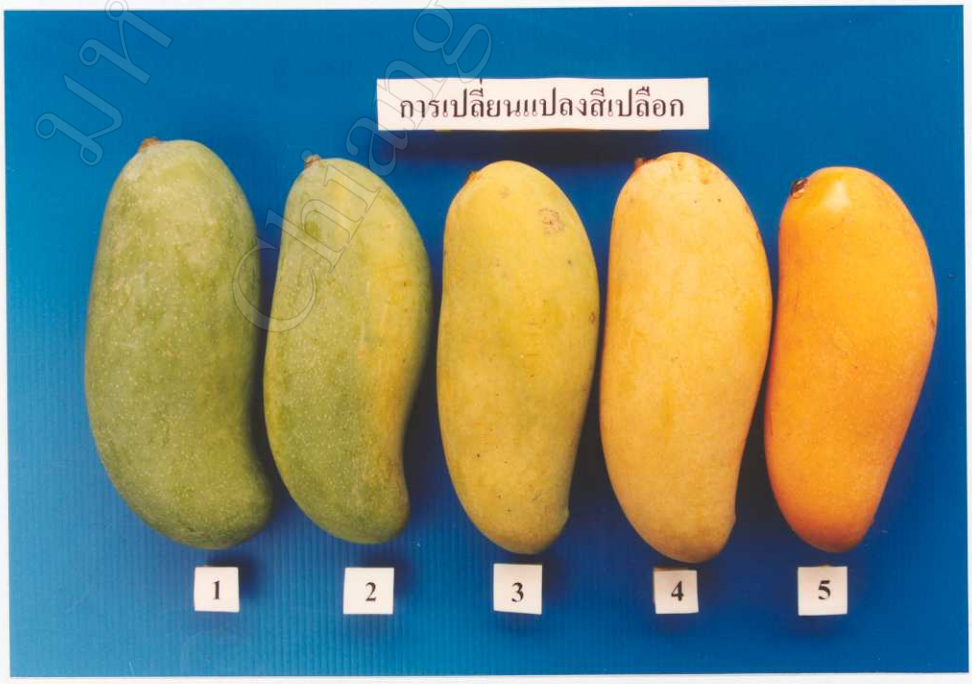
คำนวณจากสัดส่วนของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ต่อปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (TA) โดยจะแสดงรสชาติของผลมะม่วง ซึ่งค่าที่มากขึ้น แสดงว่าผลมีรสหวานเพิ่มขึ้น

8. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ตรวจสอบคุณภาพผลมะม่วงโดยผู้ประเมินจำนวน 5 คน ตลอดการทดลอง เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สีเปลือก สีเนื้อ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส การยอมรับ โดยมีระดับคะแนน ดังนี้

8.1 สีเปลือก

1 = สีเขียว
2 = สีเขียวอมเหลืองเล็กน้อย
3 = สีเขียวอมเหลือง
4 = สีเหลืองอ่อน
5 = สีเหลืองเข้ม



ภาพที่ 3 การประเมินคุณภาพด้านสีเปลือก

8.2 สีเนื้อ (ธีราพร, 2536)

1 = สีขาว
2 = สีขาวอมเหลือง
3 = สีเหลืองอ่อน
4 = สีเหลืองเข้ม
5 = สีเหลืองอมส้ม
6 = สีส้ม
7 = สีส้มแดง

8.3 คุณภาพด้านกลิ่น (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

0 = กลิ่นผิดปกติ (กลิ่นหมัก)
1 = กลิ่นดิบ
2 = ไม่มีกลิ่นดิบ
3 = กลิ่นสุกเล็กน้อย
4 = กลิ่นสุกมาก

8.4 คุณภาพด้านรสชาติ (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

0 = รสผิดปกติ
1 = รสจืด
2 = รสเปรี้ยว
3 = รสหวานอมเปรี้ยว
4 = รสหวานน้อย
5 = รสหวานปานกลาง
6 = รสหวานที่สุด

8.5 คุณภาพด้านเนื้อสัมผัส

1 = กรอบมาก
2 = กรอบปานกลาง
3 = กรอบเล็กน้อย
4 = นิ่มเล็กน้อย
5 = นิ่มปานกลาง
6 = นิ่มมาก

8.6 คุณภาพการยอมรับโดยรวม (ธีราพร, 2536)

1 = ไม่ชอบมากที่สุด
2 = ไม่ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
5 = เฉย ๆ
6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก
9 = ชอบมากที่สุด

9. อายุการวางจำหน่าย

ประเมินอายุการวางจำหน่ายจากข้อมูลการตรวจวัดคุณภาพผล และผลมะม่วงหมดอายุการวางจำหน่าย ดังนี้

9.1 ผลเหี่ยว

9.2 มีพื้นที่เกิดโรครวมกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวเปลือก หรือระดับคะแนน 4

9.3 มีกลิ่นผิดปกติหรือกลิ่นหมัก

9.4 มีรสชาติผิดปกติ

9.5 มีคุณภาพการยอมรับโดยรวมหลังจากผลสุก ต่ำกว่า 3 คะแนน

การประเมินอายุการวางจำหน่ายของผลมะม่วง อาจใช้เกณฑ์การตัดสินข้างต้นเกณฑ์ใดเกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งหรือหลายเกณฑ์ร่วมกัน

ตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนส

2.1 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

2.1.1 แยกเชื้อ *C. gloeosporioides* จากผลมะม่วงที่มีอาการของโรคแอนแทรคโนส มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้เชื้อราเจริญ 5 วัน จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จึงนำมาเลี้ยงบนอาหาร malt yeast agar (MYA) เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์เป็นจำนวนมาก เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์สีส้มปริมาณมาก ให้เทน้ำกลั่นลงจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ปลาย loop เขี่ยเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราจนหลุดจากผิวหน้าอาหาร กรองเศษวุ้นและเส้นใยเชื้อราออกด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น นับจำนวนสปอร์ที่ผ่านการกรองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย Haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสารละลายแขวนลอยสปอร์จนได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ / มิลลิลิตร และใส่สาร Tween 80 ในอัตราส่วน สารละลาย 100 มิลลิลิตร ต่อ Tween 80 0.04 มิลลิลิตร เพื่อให้สปอร์มีการกระจายตัวดีขึ้น

2.1.2 ล้างทำความสะอาดผลมะม่วงและเช็ดผลด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้พู่กันทาผลมะม่วงด้วยสารละลายแขวนลอยสปอร์ ให้ทั่วทั้งผล บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อราเจริญ

2.1.3 แช่ผลมะม่วงในสารละลายไคโตซาน ด้วยวิธีเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.25 % W/V

กรรมวิธีที่ 3 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.50 % W/V

กรรมวิธีที่ 4 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 0.75 % W/V

กรรมวิธีที่ 5 เคลือบผิวด้วยไคโตซานความเข้มข้น 1.00 % W/V

แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล เก็บรักษาผลมะม่วงไว้ที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบการเกิดโรคของผลมะม่วง โดยประเมินจากพื้นที่เกิดโรค แล้วให้ระดับคะแนนอัตราการเกิดโรคตามการทดลองที่ 1

2.2 ผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.1 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธีวัด clear zone

นำสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ / มิลลิลิตร spread plate บนจานอาหาร PDA จากนั้นวางกระดาษกรองฆ่าเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บนจานอาหาร จานละ 4 มุม หยดสารละลายไคโตซานตามกรรมวิธีต่างๆ 20 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต ลงบนกระดาษกรอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ไคโตซานความเข้มข้น 0.25 % W/V

กรรมวิธีที่ 3 ไคโตซานความเข้มข้น 0.50 % W/V

กรรมวิธีที่ 4 ไคโตซานความเข้มข้น 0.75 % W/V

กรรมวิธีที่ 5 ไคโตซานความเข้มข้น 1.00 % W/V

แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 plate เลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29 ± 2 ^{o}ซ, 80 ± 3 %RH) จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยพิจารณาจากขนาดบริเวณใสปราศจากเส้นใยรอบๆ กระดาษกรอง (clear zone)

2.2.2 การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี bioassey

ปีเปตสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อ *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปีเปตสารละลายไคโตซานตามกรรมวิธีต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำเปล่า (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ไคโตซานความเข้มข้น 0.25 % W/V

กรรมวิธีที่ 3 ไคโตซานความเข้มข้น 0.50 % W/V

กรรมวิธีที่ 4 ไคโตซานความเข้มข้น 0.75 % W/V

กรรมวิธีที่ 5 ไคโตซานความเข้มข้น 1.00 % W/V

แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 plate จากนั้นเทอาหารPDA 10 มิลลิลิตร ทับลงไป เคลื่อนจานอาหารไปมาในทิศทางบน-ล่าง 3 รอบและซ้าย-ขวา 3 รอบ เพื่อให้สารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อ *C. gloeosporioides* สารละลายไคโตซานและอาหารวุ้นเข้ากัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (29±2 °ซ, 80±3 %RH) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยพิจารณาความสามารถในการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตอนที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำร้อนและเวลาในการแช่ผลมะม่วงร่วมกับการเคลือบผิวด้วยไคโตซานต่อคุณภาพผลและการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

3.1 ผลของอุณหภูมิน้ำร้อนและเวลาในการแช่ผลมะม่วงร่วมกับการเคลือบผิวด้วยไคโตซานต่อคุณภาพผลมะม่วง

วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิน้ำร้อน 2 ระดับ คือ 52 และ 55 °ซ และปัจจัยที่ 2 คือ เวลาในการแช่มี 2 ระดับ คือ 5 และ 10 นาที โดยแช่ผลมะม่วงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำเปล่า นาน 10 นาที (ชุดควบคุม 1)
กรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำเปล่า นาน 10 นาที (ชุดควบคุม 2)
กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 °ซ นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 °ซ นาน 10 นาที
กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 °ซ นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 6 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 °ซ นาน 10นาที

ผึ่งลมไว้ 60 นาที แล้วเคลือบไคโตซานความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 1) บนผลมะม่วงกรรมวิธีที่ 2 - 5

แบ่งผลมะม่วงออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ผล นำไปตรวจวัด การสูญเสียน้ำหนัก การประเมินการเกิดโรค และการเปลี่ยนแปลงสีเปลือก กลุ่มที่ 2 จำนวน 50 ผล นำไปตรวจวัด การเปลี่ยนแปลงสีเนื้อ การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) การวัดปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (TA) และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งมีระดับคะแนนการประเมินคุณภาพเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

เก็บรักษาผลมะม่วงที่ผ่านวิธีการต่างๆ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29±2 °ซ, 80±3 %RH) และวิเคราะห์คุณภาพทุกวัน โดยกลุ่มที่ 1 ตรวจวัด 5 ผลตลอดการทดลอง และกลุ่มที่ 2 ตรวจวัด วันละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล รวม 10 ครั้ง

3.2 ผลของอุณหภูมิน้ำร้อนและเวลาในการแช่ผลมะม่วงร่วมกับการเคลือบผิวด้วยไคโตซานต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง

3.2.1 ล้างทำความสะอาดผลมะม่วงและเช็ดผลด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใช้พู่กันทาผลมะม่วงด้วยสารละลายแขวนลอยสปอร์เชื้อ *C. gloeosporioides* ให้ทั่วทั้งผล บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อราเจริญ

3.2.2 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิน้ำร้อน 2 ระดับ คือ 52 และ 55 ^{o}ซ และปัจจัยที่ 2 คือ เวลาในการแช่มี 2 ระดับ คือ 5 และ 10 นาที โดยแช่ผลมะม่วงในน้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำเปล่า นาน 10 นาที (ชุดควบคุม 1)

กรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำเปล่า นาน 10 นาที (ชุดควบคุม 2)

กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 ^{o}ซ นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 ^{o}ซ นาน 10 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 ^{o}ซ นาน 5 นาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 ^{o}ซ นาน 10นาที

ผึ่งลมไว้ 60 นาที แล้วเคลือบไคโตซานความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุด จากการทดลองที่ 1) บนผลมะม่วงกรรมวิธีที่ 2 - 5

แต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ผล เก็บรักษาผลมะม่วงที่ผ่านวิธีการต่าง ๆ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (29±2 ^{o}ซ, 80±3 %RH) ตรวจสอบการเกิดโรคของผลมะม่วง โดยประเมินจากพื้นที่เกิดโรคแล้วให้ระดับคะแนนอัตราการเกิดโรคตามการทดลองที่ 1