บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. โกร่งสำหรับบด
2. ตะกร้าใส่ผลไม้
3. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
4. เขียง มีดหั่น และมีดปอกผลไม้
5. เครื่องแก้วต่างๆ
6. ถุงและแก้วพลาสติก
7. แผ่นป้ายเครื่องหมายพลาสติก
8. กระดาษกรองเบอร์ 1 และกระดาษทิชชู
9. หลอดฟลูออเรสเซนต์
10. หลอดหยดสาร
11. อลูมิเนียมฟอยล์
12. ไมโครปิเปต
13. กล่องโฟมใส่น้ำแข็งสำหรับบด

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น Toledo PG503-S
2. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) ยี่ห้อ Multi-RF Refrigerated Centrifuge
3. เครื่อง Rotamixer & Tucker, LTD.
4. ตู้เย็นและห้องเย็น
5. Hunter's colormeter ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-200
6. UV/VIS specphotometer ยี่ห้อ Lambda 25 Spectrometer
7. pH meter ยี่ห้อ Mettler รุ่น Toledo 320
8. Spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Genesys 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. Water bath
10. Hot air oven
11. เครื่องวัดความแน่นเนื้อยี่ห้อ Drill Press

3.3 สารเคมี

1. สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ในการทดลอง
   - Methyl jasmonate (MJ)
2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน
   - Ethyl alcohol (C_2H_5OH)
   - Hydrochloric acid (HCl)
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และคาโรทีนอยด์
   - Dimethylsulphoxide (DMSO)
4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอกทิวีตีของฟีนิลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL)
   - Boric acid (H_3Bo_4)
   - Bovine Serum Albomin (BSA)
   - Cinnamic acid ($C_9H_8O_2$)
   - Copper sulphate ($CUSO_4$ 5 H_2O)
   - Foin-Ciocalteu's phenol reagent
   - Mercaptoethanol
   - Perchloric acid ($HClO_4$)
   - Phenylalanine ($C_9H_{11}NO_2$)
   - Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)
   - Potassium tartrate (COOK $(CHOH)_2$ •½ H2O)
   - Sodium borate ($Na_2B_4O_7$ •½ 10 H_2O)
   - Sodium carbonate (Na_2CO_3)
   - Sodium hydroxide (NaOH)
   - Acid–purified sand
5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค
   - Ethyl alcohol (C_2H_5OH)
   - Folin-Ciocalteu's phenol reagent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Gallic acid
- Sodium carbonate (Na_2Co_3)

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้
   - Sodium hydroxide (NaOH)
   - Phenolphthalein
7. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
   - Ethyl alcohol (C_2H_5OH)
   - Alkalic copper reagent
   - Arsenomolybdic reagent

3.4 พืชทดลอง

มะม่วงพันธุ์มหาชนกจากสวนมะม่วง ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการคัดเลือกต้นมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่สมบูรณ์อายุประมาณ 7 ปี จำนวน 40 ต้น ที่มีทรงพุ่มใกล้เคียงกัน จากนั้นติดป้ายที่ช่อดอกเพื่อให้ทราบอายุของผลที่จะนำมาใช้ในการศึกษา โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

การทดลองที่ 1 ผลของการใช้สารควบคุมเมทิลจัสโมเนทต่อการเปลี่ยนแปลงสี และคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกระหว่างการเจริญของผล

ใช้ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอายุ 84 และ 98 วันหลังดอกบานจุ่มผลมะม่วงแต่ละอายุลงในสารเมทิลจัสโมเนทร่วมกับ 0.1 % Tween 20 (ปริมาตรโดยปริมาตร v/v) ครั้งเดียวก่อนการเก็บเกี่ยวโดยใช้ผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอายุ 84 และ 98 วันหลังดอกบาน โดยแบ่งเป็น 4 ชุด ดังนี้

- ชุดที่ 1 จุ่มผลในน้ำที่มี 0.1% (v/v) Tween 20 เป็นเวลา 1 นาที (ชุดควบคุม)
- ชุดที่ 2 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 1 นาที
- ชุดที่ 3 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 mM เป็นเวลา 1 นาที
- ชุดที่ 4 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 15 mM เป็นเวลา 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.1 วิธีการให้สารเมทิลจัสโมเนทกับผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกโดยการจุ่มผล

เก็บเกี่ยวผลแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาคุณภาพหลังจากจุ่มเมทิลจัสโมเนทแล้วทุก 7 วัน โดยกลุ่มผลที่มีอายุ 84 วันเริ่มตั้งแต่ 84, 91, 98, 105, 112 และ 119 วันหลังดอกบาน เก็บผลมะม่วงครั้งละ 10 ผล (ซ้ำ) ต่อชุดการทดลอง รวมผลทั้งหมด 240 ผล และกลุ่มที่ผลมีอายุ 98 วันหลังดอกบาน เริ่มตั้งแต่ 98, 105, 112, 119 วันหลังดอกบาน รวมผลทั้งหมด 160 ผล นำไปวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงสีและคุณภาพผลหลังการเก็บเกี่ยวในเรื่องต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1.1 พื้นที่สีแดงของเปลือก

ประเมินพื้นที่สีแดงของเปลือกผล (red blush) ด้วยสายตา โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ที่มีสีแดงปรากฏบนเปลือกผลต่อพื้นที่เปลือกผลทั้งหมด

1.2 ความแน่นเนื้อของผล

นำผลมะม่วงมาวัดความแน่นเนื้อโดยเฉือนเปลือกออก 2 มิลลิเมตร ของแต่ละด้านแล้วใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อที่มีหัวกดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร กดลงไปในเนื้อผลลึก 1 เซนติเมตร อ่านค่าและคิดคำนวณออกมาเป็นหน่วย กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร (kg/cm^2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การเปลี่ยนแปลงสีเปลือก

วัดสีชิ้นเปลือกผลโดยใช้ Hunter's colormeter ยี่ห้อ Minolta รุ่น CR-200 แต่ละผลวัด 2 ครั้ง รวมทำ การวัดสี 20 ครั้งต่อชุดการทดลองค่าที่ได้จากการวัดแสดงผลเป็นค่า L*, a* และ b* โดย

ค่า L* value (The lightness factor value) เป็นค่าที่แสดงความมืดและความสว่างของสีมีค่าตั้งแต่ 0-100 ค่าต่ำแสดงว่ามีความสว่างของสีเปลือกผลน้อย ค่าสูงแสดงว่ามีความสว่างของสีเปลือกมาก

ค่า a* value (The chromaticity coordinates (hue)) เป็นค่าที่แสดงสีเขียวและสีแดง ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมีสีเขียว และถ้ามีค่าเป็นบวกจะแสดงว่าเปลือกผลมีสีแดง โดยค่า a* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60

ค่า b* value (The chromaticity coordinates (chroma)) เป็นค่าที่แ สดงสีเหลืองและสีน้ำ เงิน ถ้ามีค่าเป็นลบแสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมีสีน้ำเงิน และถ้ามีค่าเป็นบวกแสดงว่าเปลือกผล มีสีเหลือง โดยค่า b* มีค่าตั้งแต่ -60 ถึง +60

นำค่า L*, a* และ b* มาหาค่า Hue และ Chroma จากสูตร

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

h° = hue angle โดย

h° = THETA ถ้า $a^* > 0$ และ $b^* \geq 0$

h° = 180 + THETA ถ้า $a^* \leq 0$ และ $b^* \geq 0$

h° = 180 + THETA ถ้า $a^* \leq 0$ และ $b^* \leq 0$

h° = 360 + THETA ถ้า $a^* \geq 0$ และ $b^* \leq 0$

THETA = (arctangent (b/a)/6.2832) × 360

เมื่อ C^* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากมีค่าสูงเข้าใกล้ 60 วัตถุมีสีเข้ม

h^* มีค่าเข้าใกล้มุม 0 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีแดง หากมีค่าเข้าใกล้ 90 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเหลือง และถ้ามีค่าเข้าใกล้ 180 องศา สีของวัตถุจะอยู่ในกลุ่มสีเขียว

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยใช้ estimation of total anthocyanin method ซึ่งเป็นวิธีการของ Ranganna (1997) โดยนำเปลือกผลหนัก 2.5 กรัม มาหั่นละเอียด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย ethanolic HCl ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิ 4 ˚C เป็นเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย ethanolic HCl จากนั้นนำสารละลาย ที่ได้ไปวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 535 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ ethanolic HCl เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นนำค่า absorbance ที่อ่านได้ไปคำนวณเพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด (mg/100 g fresh weight) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{Absorbance at 535 nm} \times \text{Final volume} \times 100}{\text{Weight (g)}}$$

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

3. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์และคาโรทีนอยด์ทั้งหมด

การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทั้งหมดตามวิธีการของ Pawelizik (2006) โดยนำเปลือกผลหนัก 2.5 กรัม มาหั่นละเอียด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร คนตัวอย่างพืชด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะมืดนาน 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ dimethylsulphoxide เป็นตัวเปรียบเทียบจากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปแทนค่าในสูตรหาปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ทั้งหมด มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักสด (µg/g fresh weight) โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้

$$\text{Chlorophyll a content} = [(12.19 \times \text{absorbance at } 665) - (3.45 \times \text{absorbance at } 649)]$$

$$\text{Chlorophyll b content} = [(21.99 \times \text{absorbance at } 649) - (5.32 \times \text{absorbance at } 665)]$$

$$\text{Total chlorophyll content} = \text{chlorophyll a} + \text{chlorophyll b}$$

$$\text{Total carotenoid content} = \frac{[(1000 \times \text{absorbance at } 480) - (2.14 \times \text{chlorophyll a}) - (70.16 \times \text{chlorophyll b})]}{220}$$

4. การเปลี่ยนแปลงแอกทิวิตีของแอนไซม์ PAL

การสกัดและวิเคราะห์แอกทิวิตีของฟีนิลอะลานีน แอมโมเนีย-ไลเอส (PAL) ดัดแปลงจากวิธีการของ Faragher and Chalmres (1997) และ Arakawa *et al.* (1986) โดยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1 การสกัดเอนไซม์ PAL (extraction of PAL)

ทำการสกัดเอนไซม์ PAL ภายใต้อุณหภูมิ 4 ˚C โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก 5 กรัม ด้วยสารละลายสกัด ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M borate buffer (pH 8.8) 14 mM mercaptoethanol และ 10 % polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) นาน 15 นาที แล้วนำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หาแอกทิวิตีของเอนไซม์ PAL ในขั้นตอนต่อไป

4.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ PAL (PAL enzyme assay)

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 40 mM phenylalanine 1 มิลลิลิตร และ 0.1 M borate buffer (pH 7) 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายดังกล่าว (ชุดการเปรียบเทียบ ให้เติมน้ำกลั่นแทน crude enzyme) ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 4 มิลลิลิตร วางหลอดทดลองนี้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 ˚C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 2 N perchloric acid 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำสารผสมนี้ไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 10 ˚C นำของเหลวเฉพาะส่วนบน (supernatant) วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS-spectrophotometer จากนั้นนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ เกิดขึ้นโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ cinnamic acid (ภาพภาคผนวก 1)

4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (protein assay)

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) โดยเจือจาง crude enzyme ลง 100 เท่า นำ crude enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มี alkaline copper enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 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) วางสารผสมนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม 50% phenol reagent 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารละลายผสมที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาพภาคผนวก 2) ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 1 กรัม น้ำหนักสด (mg/g fresh weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

ปริมาณโปรตีน (mg/g fresh weight) = 0.4Y

เมื่อ Y = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการทดลองนี้ นำค่าที่ได้จากขั้นตอนที่ 4.2 และ 4.3 มาคำนวณหาค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ PAL ซึ่งมีหน่วยเป็น นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน•ชั่วโมง (nM /mg protein•hr)

5. การเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

การสกัดและการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีการของ Singleton and Rossi (1965) และ Ketsa and Atantee (1998) โดยมี 2 ขั้นตอนดังนี้

5.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิค

ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิคภายใต้อุณหภูมิ 4 ˚C โดยการบดและสกัดเปลือกผลหนัก3 กรัม ด้วยสารละลาย 80% ethanol ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่ 4 ˚C นำเฉพาะของเหลวซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดต่อไป

5.2 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

นำ crude enzyme ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค โดยเจือจาง crude enzyme ลง 100 เท่า เติม crude enzyme ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย 10% folin-ciocalteu's phenol reagent 10 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที จากนั้นเติม 7.5% Na_2CO_3 8 มิลลิลิตร ลงไปในขวดรูปชมพู่ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายผสมที่ได้นี้ไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (ภาพภาคผนวก 3) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดที่ได้มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด (mg/100 g fresh weight) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (mg/100 g fresh weight) = 454.55 Y

เมื่อ Y = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 765 nm

6. การวัดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

6.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำได้ (total soluble solids)

นำน้ำคั้นจากเนื้อผลของมะม่วงแต่ละชุดมาตรวจวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำได้ โดยใช้ hand refractometer ก่อนใช้ปรับสเกลให้เป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่น แล้วคั้นน้ำจากกากเนื้อผลหยดลงบนหน้าปัด อ่านค่าที่ได้ซึ่งมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์บริกซ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity)

ใช้น้ำคั้นมะม่วง 2 มิลลิลิตร มาไทเทรตด้วยสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH (0.1 N) โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ ของ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อปริมาณกรดในน้ำคั้นถูกใช้ไปหมดแล้ว NaOH ส่วนเกินจะทำปฏิกิริยา phenolphthalein สีชมพูขึ้น ถือว่าเป็นจุดยุติ (end point) แล้วนำค่าของสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH ที่ถูกใช้ไปมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด (คิดในรูปกรดซิตริก)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (ml)} \times 0.064^{*} \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นมะม่วง (ml)}}$$

หมายเหตุ : *milliequivalent weight of citric acid (anhydrous) = 0.064

6.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Nelson 's reducing sugar (Hodge and Hofreiter, 1962) มีวิธีการดังนี้

6.3.1 นำเปลือกมะม่วงมาอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 °C แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นชั่งมา 0.05 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25×150 มิลลิลิตร แล้วเติม ethanal 80 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยลูกแก้ว นำไปอบที่ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเขย่าหลอดทุกๆ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ระหว่างเอทานอลกับน้ำตาลหลัง จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ปรับปริมาตรของสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

6.3.2 นำสารละลายที่สกัดได้จากข้อ 6.3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วทำ blank ควบคู่ไปด้วย โดยเติมน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง เติม Nelson's alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที หลังจากนั้นแช่หลอดในน้ำเย็นจนสารละลายในหลอดเย็นลงซึ่งจะเกิดตะกอนของ CuO_2 แล้วเติม asenomolybdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าจนตะกอนของ CuO_2 ละลายหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เท่ากัน 6.3.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6.3.2 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดจากค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Spectronic 21) โดยปรับค่า absorbance ของ blank ให้อ่านค่าได้เท่ากับศูนย์ก่อน นำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับสมการที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐาน D-glucose (ภาพภาคผนวก 4) ผลการวิเคราะห์ที่ได้เปรียบเทียบกับมิลลิกรัมของ D-glucose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ผลของการใ ช้สารควบคุมจัสโมเนทต่อก ารเปลี่ยนแปลงสี และคุณภาพ ของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกหลังการเก็บเกี่ยว

เก็บเกี่ยวผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่มีอายุ 112 วันหลังดอกบาน มาจุ่มสารเมทิลจัสโมเนทร่วมกับ 0.1% (v/v) Tween 20 ให้กับผลในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเป็น 4 ชุด ดังนี้

- ชุดที่ 1 จุ่มผลในน้ำที่มี 0.1% (v/v) Tween 20 เป็นเวลา 1 นาที (ชุดควบคุม)
- ชุดที่ 2 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 1 นาที
- ชุดที่ 3 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 10 mM เป็นเวลา 1 นาที
- ชุดที่ 4 จุ่มผลในเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 15 mM เป็นเวลา 1 นาที

นำผลมาไว้ที่ 15 ˚C ร่วมกับการให้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นระยะเวลา 21 วัน จากนั้นนำผลไปวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงสีและคุณภาพผลหลังการเก็บเกี่ยวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทุก 7 วัน โดยเริ่มตั้งแต่ 0, 7, 14, และ 21 วัน ตามลำดับ โดยใช้มะม่วงชุดการทดลองละ 10 ผล (ซ้ำ) รวมผลทั้งหมด 160 ผล

3.6 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวยรวมข้อมูล

1. สวนมะม่วง ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว และสรีรวิทยาพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.7 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

มิถุนายน พ.ศ. 2551 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved