บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุพันธุ์พืช

1.1 ผลส้มเขียวหวาน มาตรฐานเบอร์ 0 มาจากแหล่งปลูกในจังหวัดแพร่

1.2 นำตัวอย่างผลส้มเขียวหวาน ที่มีอาการของโรคราสีเขียวปรากฏบนผล มาแยกเชื้อราสาเหตุโรคออกมาให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี tissue transplanting เมื่อได้เชื้อราสาเหตุแล้วจึงเก็บไว้ศึกษาตามหัวข้อต่าง ๆ ที่มีความจำเป็นต้องปลูกเชื้อต่อไป

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่องวัดสี (Chroma meter) ของบริษัท Minolta ตัวเครื่อง CR-300 หัววัด CR-310 และใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 ซึ่งวัดสีออกมาเป็น L* a* และ b* โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

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* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* เข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีความสว่าง

a* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีเขียว

b* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีเทา

C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากมีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึงวัตถุมีสีเข้ม

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

2.2 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand Refractometer) ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 อ่านค่าตั้งแต่ 0-32 องศาบริกซ์ (Brix)

2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบทศนิยม 2 ตำแหน่งของบริษัท Sartorius รุ่น BA 3100P และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น AB 54

2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างของบริษัท Hanna รุ่น HI 6021

2.5 เครื่องปั่นแยกน้ำแยกกาก ของบริษัท Moulinex รุ่น 753

2.6 Water bath

2.7 ตู้เขี่ยเชื้อ

2.8 พลาสติกโพลีเอทธิลีน และ พลาสติกโพลีเอทธิลีนที่มีความหนาแน่นสูง

2.9 กระดาษกรอง Whatman No.1

2.10 เครื่องแก้ว

- บีกเกอร์
- หลอดทดลอง
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- Volumetric flask
- แท่งแก้วคน
- ปิเปต
- บิวเรท
- จานเลี้ยงเชื้อ (Petridish)
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- ช้อนตักสาร
- กรวยกรอง
- ขวดปิดสนิท (sealed vial)

2.11 เครื่อง Headspace Sampler ของบริษัท Hewlett Packard รุ่น HP 7694 E

2.12 เครื่อง Gas Chromatography (GC) ของบริษัท Hewlett Packard รุ่น HP-6890 โดยมีรายละเอียดดังนี้

- Detector : Flame ionization detector (FID)
- Column : FFAP ขนาด ยาว 25 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 320 ไมครอน ความหนาของฟิล์ม 0.52 ไมครอน
- Carrier gas : ก๊าซฮีเลียม โดยมี ก๊าซไนโตรเจน เป็น make up flow
- อุณหภูมิ column : 40 °ซ เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นทุก ๆ 1 นาที เพิ่มทีละ 1 °ซ จนถึง 180 °ซ ใช้เวลา 15.33 นาที

3. สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณกรดที่ไตเตรตได้

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , Merck) เตรียมความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล

3.2 สารเคมีที่ใช้หาปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (Oxalic acid, Merck) เตรียมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 % โดยชั่งกรดออกซาลิกมา 4 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

- 2 , 6 – ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2 , 6 – dichlorophenol – indophenol , Merck) เข้มข้น 0.04% เตรียมโดยชั่ง 2,6 ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (Ascorbic acid , Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.001 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4% ปริมาตร 40 มล แล้วนำไปไตเตรตกับ 2 , 6 – ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล เข้มข้น 0.04% จนถึงยุติ แล้วบันทึกปริมาตร 2 , 6 – ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไปเพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคเน่าราสีเขียว

- โซเดียมออโธฟีนิลฟีเนต (SOPP)
- เบนเลท (Benlate OD)
- ไบฟีนิล (Biphenyl)
- อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)
- เอทธานอล (Ethanol)

4. สถานที่ทำการทดลอง

4.1 ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การทดลองที่ 1 วิธีการควบคุมโรคโดยใช้เอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์

ควบคุมโรคเน่าราสีเขียวหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้มเขียวหวาน โดยใช้เอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ เปรียบเทียบกับการควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ

ตอนที่ 1 การควบคุมโรคโดยวิธีการแช่ผลส้มเขียวหวาน ลงในสารเคมี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 วินาที รวมมี 14 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 10 %
กรรมวิธีที่ 2 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 20 %
กรรมวิธีที่ 3 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 40 %
กรรมวิธีที่ 4 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.5 %
กรรมวิธีที่ 5 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1.0 %
กรรมวิธีที่ 6 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1.5 %
กรรมวิธีที่ 7 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 0.5 %
กรรมวิธีที่ 8 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 1.0 %
กรรมวิธีที่ 9 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 2.0 %
กรรมวิธีที่ 10 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.01 % แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 11 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.05 % แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 12 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.1 % แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 13 ชุดควบคุม ปลูกเชื้อ แต่ไม่ควบคุมโรค
กรรมวิธีที่ 14 ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อ ไม่ควบคุมโรค

ตอนที่ 2 การควบคุมโรคโดยวิธีการรมด้วยไอระเหยของสาร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน รวมมี 11 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.01 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 2 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 3 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.10 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 4 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01% ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 5 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.03% ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 6 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 7 รมไอระเหยไบฟีนิล ที่ความเข้มข้น 0.5 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 8 รมไอระเหยไบฟีนิล ที่ความเข้มข้น 1.0 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 9 รมไอระเหยไบฟีนิล ที่ความเข้มข้น 1.5 % ปริมาตร/ปริมาตร
กรรมวิธีที่ 10 ชุดควบคุม ปลูกเชื้อ แต่ไม่ควบคุมโรค
กรรมวิธีที่ 11 ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อ และไม่ควบคุมโรค

วิธีการทดลอง

1. เตรียมส้มเขียวหวาน ชั้นมาตรฐาน 0 มาจากแหล่งปลูกในจังหวัดแพร่ นำมาล้างน้ำสะอาด 2 ครั้ง จนสะอาด แล้วผึ่งให้แห้ง นำส้มเขียวหวานไปแช่ในแอลกอฮอล์ ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิวของผลส้ม จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง คัดเลือกผลส้มให้ได้ลักษณะผลที่เหมือนกันอีกครั้ง

2. เตรียมสปอร์เชื้อรา *Penicillium* sp. ที่แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) ความเข้มข้นของสปอร์ เท่ากับ 1×10^{6} สปอร์/มล

3. นำผลส้มเขียวหวานในข้อ 1 มาปลูกถ่ายเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยจุ่มลงในสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. ที่แขวนลอยในน้ำ แทงผลส้มลึก ประมาณ 2 – 3 มม จำนวน 4 จุด ให้มีระยะห่างเท่า ๆ กันรอบผลส้ม แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. นำผลส้มในข้อ 3 แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกนำไปผ่านตามกรรมวิธีการควบคุมโรคโดยวิธีการแช่สาร และชุดที่สองนำไปผ่านตามกรรมวิธีการควบคุมโรคโดยวิธีการรมสาร ในกล่องกระดาษลูกฟูก ที่มีขนาดกว้าง 25 ซม ยาว 46 ซม สูง 9 ซม โดยแต่ละกรรมวิธีมี 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยผลส้ม 4 ผล

5. นำผลส้มที่ได้จากในข้อ 4 ชุดแรกไปบรรจุในถาดพลาสติก แล้วนำไปใส่กล่องกระดาษลูกฟูก ที่คลุมด้วยพลาสติกโพลีเอทธิลิน (polyethylene) ส่วนส้มชุดที่สองนำไปบรรจุในถาดพลาสติก แล้วนำไปใส่กล่องกระดาษลูกฟูกและใส่ในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density polyethylene fillm; HDPE) จนครบกำหนดเวลาที่ใช้รมเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องทั้งสองชุด

6. บันทึกผลการทดลองทุกวันหลังจากควบคุมโรคจนกว่าจะหมดอายุการเก็บรักษา หรือผลส้มถูกเชื้อราทำลายจนเชื้อราสร้างสปอร์เต็มพื้นที่ผิวส้ม

6.1 ระดับของการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธี

การเกิดโรคของผลส้ม พิจารณาจากการปรากฏของเส้นใยของเชื้อราที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค จากสูตร

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

6.2 ผลการควบคุมโรคในแต่ละกรรมวิธี

ผลการควบคุมโรค แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการเน่าเสีย คำนวณได้จาก

$$\% \text{ ยับยั้งการเน่าเสีย} = \frac{\% \text{ การเกิดโรคชุดควบคุม} - \% \text{ การเกิดโรคชุดทดลอง}}{\% \text{ การเกิดโรคชุดควบคุม}}$$

6.3 ระดับการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนผิวส้ม

การสร้างสปอร์ของเชื้อราบนผิวส้ม พิจารณาจากการปรากฏของสปอร์สีเขียวของเชื้อราที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวที่เกิดสปอร์เทียบกับพื้นที่ผิวของทั้งผล ประเมินและให้คะแนนดังนี้

0 = ไม่มีสปอร์ปรากฏให้เห็นด้วยตาเปล่า (0 เปอร์เซ็นต์)

1 = มีสปอร์ปรากฏ 1 – 25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวผล

2 = มีสปอร์ปรากฏ 26 – 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวผล

3 = มีสปอร์ปรากฏ 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวผล

4 = มีสปอร์ปรากฏ 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวผล

การทดลองที่ 2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการควบคุมโรค

นำผลการทดลอง ที่ดีที่สุดในแต่ละกรรมวิธี มาศึกษาต่อโดยแปรผันระยะเวลาในการควบคุมเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมโรค จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ในการทดลองที่ 1 พบว่า

ตอนที่ 1 การควบคุมโรคด้วยวิธีการแช่ด้วยสารต่าง ๆ ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในแต่ละสาร คือ เอทธานอล ที่ความเข้มข้น 20 % อะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 1.5 % โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ที่ความเข้มข้น 2.0 % และ เบนเลท ความเข้มข้น 0.10 %

ตอนที่ 2 การควบคุมโรคโดยวิธีการรมด้วยไอระเหยของสารต่างๆ ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในแต่ละสารคือ ไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01% สำหรับไอระเหยของไบฟีนิล ทุกความเข้มข้นพบว่าไม่สามารถควบคุมโรคเน่าราสีเขียวได้โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทำการควบคุมโรค แต่สามารถป้องกันการเกิดสปอร์ของเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ดี

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การควบคุมโรคโดยวิธีการแช่ผลส้มเขียวหวานลงในสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รวมมี 14 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 120 วินาที
กรรมวิธีที่ 2 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 150 วินาที
กรรมวิธีที่ 3 แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 180 วินาที
กรรมวิธีที่ 4 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1.5 % เป็นเวลา 120 วินาที
กรรมวิธีที่ 5 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1.5 % เป็นเวลา 150 วินาที
กรรมวิธีที่ 6 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1.5 % เป็นเวลา 180 วินาที
กรรมวิธีที่ 7 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 2.0 % เป็นเวลา 120 วินาที
กรรมวิธีที่ 8 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 2.0 % เป็นเวลา 150 วินาที
กรรมวิธีที่ 9 แช่โซเดียมออโซฟีนิลฟีเนต ความเข้มข้น 2.0 % เป็นเวลา 180 วินาที
กรรมวิธีที่ 10 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 120 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 11 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 150 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 12 แช่เบนเลท ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 180 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 13 ชุดควบคุม ปลูกเชื้อ แต่ไม่ควบคุมโรค
กรรมวิธีที่ 14 ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อ และไม่ควบคุมโรค

ตอนที่ 2 การควบคุมโรคโดยวิธีการรมด้วยไอระเหยของสาร ที่อุณหภูมิห้อง รวมมี 8 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 1 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 3 วัน

กรรมวิธีที่ 3 รมไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธีที่ 4 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01%ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 1 วัน

กรรมวิธีที่ 5 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01%ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 3 วัน

กรรมวิธีที่ 6 รมไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01%ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธีที่ 7 ชุดควบคุม ปลูกเชื้อ แต่ไม่ควบคุมโรค

กรรมวิธีที่ 8 ชุดควบคุม ไม่ปลูกเชื้อ และไม่ควบคุมโรค

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองซ้ำเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 แต่ในกรรมวิธีการควบคุมโรคโดยวิธีการรมด้วยสาร และบันทึกผลการทดลองในวันที่ 1 3 และ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การทดลองที่ 3 ผลของเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ ต่อคุณภาพของผลส้ม

นำผลการทดลองที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคด้วยเอทธานอล และ อะซีตัลดีไฮด์ มาศึกษาต่อเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และองค์ประกอบทางเคมีของผลส้มเขียวหวาน จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 2 พบว่า

ตอนที่ 1 ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ดีที่สุดคือ แช่เอทธานอล ความเข้มข้น 20 % เป็นเวลา 180 วินาที แช่อะซีตัลดีไฮด์ความเข้มข้น1.0 %เป็นเวลา 180 วินาที

ตอนที่ 2 ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ดีที่สุดคือ รมด้วยไอระเหยเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 3 วัน และ รมด้วยไอระเหยอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01% ปริมาตร/ปริมาตร เป็นเวลา 3 วัน

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์

วิธีการทดลอง

นำผลการทดลองที่ดีที่สุดในแต่ละกรรมวิธี จากการทดลองที่ 2 มาทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง แล้วนำผลส้มที่ผ่านกรรมวิธีควบคุมโรค รวมทั้งชุดควบคุม มาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของผลส้มดังนี้ สีผิว ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ปริมาณวิตามินซี และการยอมรับในการบริโภค

1. สีผิว วัดโดยใช้เครื่อง Chroma meter ของบริษัท Minolta รุ่น CR 300 ทำการวัดสีเปลือก 4 จุด รอบ ๆ ผลส้ม ค่าที่ได้จากการวัดแสดงเป็นค่า L*, a*, b*, C* และ h°

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS) วัดโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 โดยใช้น้ำคั้นที่ได้จากผลส้มแต่ละกรรมวิธีมาหยดลงบนแผ่นปริซึมของ เครื่องมือ ค่าที่ได้จากการวัดแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายน้ำได้

3. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (tritratable acidity; TA) นำผลส้ม 4 ผล จากแต่ละกรรมวิธีมาคั้นน้ำ แล้วนำน้ำคั้นที่ได้ 25 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 100 มล แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายด่างมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล โดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ของบริษัท Hanna รุ่น HI 9021 จนสารละลายมีค่า pH เท่ากับ 8.2 แล้วจึงคำนวณหาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้จากสูตร

$$\% \text{ TA} = \text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1N)} \times \text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (มล)} \times 0.064^{*} \times \frac{100}{25}$$

*milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

4. ปริมาณวิตามินซี (ascorbic acid) วิเคราะห์ตามวิธี Indophenol นำน้ำส้มคั้นที่ได้มา 10 มล เติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตรของเหลวเท่ากับ 100 มล กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำของเหลวที่กรองได้มา 10 มล แล้วเติมกรดออกซาลิกให้ครบ 40 มล แล้วจึงนำไปไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล แล้วคำนวณตามสูตร

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

a = ปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ในการไตเตรทกับสารตัวอย่าง

b = ปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ในการไตเตรทกับวิตามินซีมาตรฐาน

c = ปริมาตรสารตัวอย่าง (มล)

5. การยอมรับของผู้ชิม โดยนำส้มจากแต่ละกรรมวิธีมาปอกเปลือก และจัดเรียงใส่ถาด แล้วให้ผู้ชิมจำนวน 5 คน เป็นคนชิมแล้วให้คะแนนดังนี้

1 = ไม่ชอบมาก

2 = ไม่ชอบ

3 = เฉย ๆ

4 = ชอบ

5 = ชอบมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

การทดลองที่ 4 วิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ ในผลส้ม

จากผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ในการทดลองที่ 2 นำผลการทดลองที่ดีที่สุดในกรรมวิธีการควบคุมโรคโดยใช้เอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ มาศึกษาต่อเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างของเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ ในผลส้ม เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี ดังนี้
กรรมวิธีที่ 1 แช่เอทธานอล ที่ความเข้มข้น 20 % ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 150 วินาที
กรรมวิธีที่ 2 แช่อะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 1.5 % ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 150 วินาที
กรรมวิธีที่ 3 รมเอทธานอล ที่ความเข้มข้น 0.05% ปริมาตร/ปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน
กรรมวิธีที่ 4 รมอะซีตัลดีไฮด์ ที่ความเข้มข้น 0.01% ปริมาตร/ปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3วัน
กรรมวิธีที่ 5 ชุดควบคุม ไม่ทำการปลูกเชื้อ ไม่ทำการควบคุมโรค

วิธีการทดลอง

หาปริมาณเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ที่ตกค้างที่เนื้อส้มตามวิธีการของ Shaw *et al.* (1992) นำผลส้มที่คัดเลือกแล้ว ไปผ่านตามกรรมวิธีที่ 1-5 แล้วนำไปคั้นน้ำโดยใช้เครื่องปั่นแยกน้ำแยกกาก ของบริษัท Moulinex รุ่น 753 นำน้ำคั้นที่ได้มา 1 มล ใส่ลงในขวดปิดสนิท (sealed vial) นำเข้าเครื่อง headspace sampler ของบริษัท Hewlett Packard รุ่น HP 7694 E ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง gas chromatography ของบริษัท Hewlett Packard รุ่น HP-6890

การบันทึกผล นำค่าที่ได้ซึ่งจะแสดงออกมาเป็นกราฟไปคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ ค่าที่ได้จากการคำนวณจะแสดงออกมาเป็น มล สาร/ ลิตร น้ำส้มคั้น

นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณเอทธานอล และอะซีตัลดีไฮด์ ในชุดควบคุม เพื่อแสดงค่าปริมาณสารที่ต่างกันเป็นปริมาณสารตกค้างที่พบในชุดควบคุมโรค