บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

ผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 70 (พันธุ์ Toyonoka) ผลเกรด 2 แต่ละผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม และมีสีแดงของผลประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บเกี่ยวจากแปลงของเกษตรกร แล้วขนส่งมายังโรงคัดบรรจุ มูลนิธิโครงการหลวง ภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายในวันเดียวกัน

อุปกรณ์

1. กล่องไม้ ขนาดความกว้าง 60 เซนติเมตร ยาว 80 เซนติเมตร และสูง 60 เซนติเมตร
2. กล่องพลาสติก ขนาดความกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร และสูง 5 เซนติเมตร
3. เครื่องวัดสี (Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta)
4. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Metex Hunter Spring model LKG-10 kg/div)
5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer ของ ATAGO)
6. Brinkmann digital burette
7. counting chamber slide (haemacytometer) ความลึก 0.1 มิลลิเมตร ของ Boeco
8. cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
9. micropipette
10. สไลด์หลุม
11. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มเบอร์ 25

สารเคมี

เอลิลไอโซไธโอไซยาเนท ชนิดที่สกัดจากน้ำมันมัสตาร์ด (mustard essential oil) ความเข้มข้น 97 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท ลานนาโปรดักส์ จำกัด จังหวัดลำพูน

อาหารเลี้ยงเชื้อ

malt extract agar (MEA) (ภาคผนวกหน้า 99)

potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวกหน้า 99)

วิธีการวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการรมด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทต่อเชื้อสาเหตุหลังการเก็บเกี่ยว และตอนที่ 2 ศึกษาผลของเอลิล ไอโซไธโอไซยาเนทร่วมกับอุณหภูมิต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลสตรอเบอรี่

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการรมเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทต่อเชื้อสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 70

1.1. ศึกษาชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากผลสตรอเบอรี่ที่เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว

ทำการแยกและตรวจสอบเพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ (identify) ของเชื้อสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวที่พบบนผลสตรอเบอรี่พันธ์พระราชทานเบอร์ 70 โดยใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเนื้อผลสตรอเบอรี่บริเวณที่เกิดการเน่าเสีย แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร malt extract agar (MEA) จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะของโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อกับเอกสารอ้างอิง (Von Arx, 1981)

1.2. ศึกษาผลของเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทต่อเชื้อราที่แยกได้จากผลสตรอเบอรี่

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1.1. มาศึกษาผลของเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทที่มีต่อเชื้อสาเหตุของโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลสตรอเบอรี่ ดังนี้

1.2.1. ผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

นำเส้นใยเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้จากผลสตรอเบอรี่มาเลี้ยงในจานอาหาร MEA ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญจนเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาเจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อรา โดยนำมาวางลงบนจุดกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปล่อยให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 87 เปอร์เซ็นต์) จนได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 มิลลิเมตร จึงนำมาทดสอบกับเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท มี 3 ระดับ คือ 0.01, 0.03 และ 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตรของอากาศในกล่องพลาสติกที่บรรจุจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการรม มี 5 ระดับ คือ 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ โดยนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อบรรจุลงในกล่องพลาสติกที่มีขนาดความกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร และสูง 5 เซนติเมตร ซึ่งคำนวณปริมาตรไว้แล้ว เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เผยอขึ้นเพียงเล็กน้อย แล้วทำการรมด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท โดยใช้กระบอกฉีดยาฉีดสารลงไปในสำลีที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกจากนั้นหุ้มกล่องพลาสติกด้วย

แผ่นพลาสติก polyvinyl chloride (PVC) ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่ระยะเวลา 3, 6, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังทำการรมด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท

1.2.2. ผลต่อการงอกของสปอร์

นำสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิดมาศึกษาการงอกของ germ tubes โดยเพาะเลี้ยงในจานอาหาร PDA เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการสร้างสปอร์มารมด้วยสารเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท ความเข้มข้น 0.01, 0.03 และ 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตรของอากาศ เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ หลังจากรมครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วจึงทำการเตรียมสารละลายแขวนลอยสปอร์ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนผิวหน้าของจานอาหารใช้ห่วงถ่ายเชื้อลนไฟจนร้อนแดง รอให้เย็นแล้วเขี่ยบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเบา ๆ เพื่อให้สปอร์ของเชื้อราหลุดจากผิวหน้าอาหาร นำสารแขวนลอยที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อเพื่อกรองเศษวุ้นและเส้นใยเชื้อราออก เขย่าสารแขวนลอยที่กรองได้ให้เข้ากัน ตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ counting chamber slide (haemacytometer) และเครื่องนับ (counter) ปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยสปอร์ให้ได้จำนวน $\times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วจึงเก็บสารแขวนลอยสปอร์ไว้ในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดด้วยสำลี

การศึกษาความยาวของ germ tubes โดยทำการตรวจวัดการงอกของสปอร์ที่ระยะเวลา 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการรมสาร เมื่อครบระยะเวลาตามที่กำหนดไว้ข้างต้นแล้วหยดสารแขวนลอยสปอร์ลงในสไลด์หลุม จากนั้นหยดสารละลาย lactophenol cotton blue ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วใช้น้ำยาทาเล็บชนิดใสทาปิดขอบสไลด์ รอจนน้ำยาทาเล็บแห้ง ตรวจดูการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดความยาวของ germ tubes ที่วัดได้ ถ้ายาวกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสปอร์ ถือว่าสปอร์งอก

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของการใช้เอลิลไอโซไธโอไซยาเนทร่วมกับอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลสตรอเบอรี่

การเตรียมผลสตรอเบอรี่

นำผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 70 (ผลเกรด 2) ที่มีขนาดสม่ำเสมอกันและไม่มีรอยช้ำหรือตำหนิ มาบรรจุลงในถาดพลาสติกที่มีความกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 14 เซนติเมตร และสูง 4 เซนติเมตร จำนวนถาดละ 10 ผล

การรมผลสตรอเบอรี่ด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) บรรจุผลสตรอเบอรี่ลงในถาดพลาสติก คำนวณปริมาตรของผลสตรอเบอรี่รวมทั้งถาดพลาสติก แล้วนำไปบรรจุรวมกันในกล่องไม้ที่มีความกว้าง 60 เซนติเมตร ยาว 80 เซนติเมตร และสูง 60 เซนติเมตร จากนั้นจึงคำนวณปริมาตรของอากาศที่เหลืออยู่ภายในกล่องไม้ แล้วทำการรมด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทโดยใช้กระบอกฉีดยาฉีดสารลงไปในสำลีที่ใส่ไว้ในบีกเกอร์ที่วางในกล่องไม้ จากนั้นปิดฝากล่องให้สนิท

การทดสอบผลของเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทต่อคุณภาพของผลสตรอเบอรี่ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.1.ศึกษาความเข้มข้นของเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทต่อกลิ่นและรสชาติของผลสตรอเบอรี่

ทำการรมผลสตรอเบอรี่ด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนท ความเข้มข้น 0.01, 0.03 และ 0.05 มิลลิลิตรต่อลิตรของอากาศ ด้วยระยะเวลาที่เหมาะสมจากตอนที่ 1.2 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 87 เปอร์เซ็นต์) เพื่อทดสอบกลิ่นและรสชาติของผลสตรอเบอรี่ภายหลังการรมสาร

2.2.ศึกษาระยะเวลาในการรมผลด้วยเอลิลไอโซไธโอไซยาเนทและอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณภาพของผลสตรอเบอรี่

ทำการรมผลสตรอเบอรี่ด้วยความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดรสชาติและกลิ่นผิดปกติจากตอนที่ 2.1. เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 ถาด แต่ละถาดมี 10 ผล ตรวจวัดผลทุก 2 วันในชุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส และทุกวันในชุดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงสีผิวของผลสตรอเบอรี่ วัดด้วยเครื่องวัดสี (Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta) บริเวณกึ่งกลางของผล ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L*, a* และ b*

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

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

ค่า L* มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 เมื่อค่า L* มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L* มีค่าเท่ากับ 0 วัตถุจะมีสีดำ แต่ถ้าค่า L* มีค่าเข้าใกล้ 100 วัตถุจะมีความสว่างสดใส สำหรับค่า a* และ b* มีค่าอยู่ในช่วง –60 ถึง +60 เมื่อค่า a* มีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว ส่วนค่า b* เมื่อมีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน แต่ถ้าหากทั้งค่า a* และ b* มีค่าเป็นศูนย์ แสดงว่าวัตถุเป็นสีเทา

2. เปอร์เซ็นต์สีแดงของผล ประมาณส่วนของผิวผลที่เป็นสีแดงออกเป็นเปอร์เซ็นต์โดยใช้ประสาทสัมผัสทางสายตา

3. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยการนับจำนวนผลที่แสดงอาการของโรคหรือเกิดการเน่าเสีย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลที่เน่าเสีย}}{\text{จำนวนผลทั้งหมด}} \times 100$$

4. ความแน่นเนื้อ (firmness) วัดด้วย firmness tester (Metex hunter spring model LKG-10 kg/div) โดยทำการวัดผลละ 1 ตำแหน่ง ตรงบริเวณกึ่งกลางของผล วิธีการวัดผลเป็นแบบทำลายตัวอย่าง (destructive method) โดยใช้หัวเจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

5. ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS) วัดด้วย hand refractometer โดยใช้น้ำคั้นสตรอเบอรี่ ก่อนอ่านค่าต้องปรับค่าให้เป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่น

6. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity; TA) โดยใช้น้ำคั้นสตรอเบอรี่ จำนวน 3 ผล กรองผ่านผ้าขาวบาง จำนวน 25 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (N) วัดด้วย digital burette แล้วทำการคำนวณหาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ จากสูตร (Pearson, 1971)

$$\text{TA (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH มาตรฐาน (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH (ลบ.ซม.)} \times \text{meq.of citric acid}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้น (ลบ.ซม.)}} \times 100$$

milliequivalent (meq.) of citric acid (anhydrous) = 0.064

7. อัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (TSS/TA ratio) คำนวณโดยใช้ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้หารด้วยปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

การประเมินคุณภาพของผลสตรอเบอรี่

ทำการคัดเลือก panel tester จำนวน 5 คนโดยเลือกบุคคลที่มีอายุ 23-24 ปี เพศหญิง 3 คน และเพศชาย 2 คน ซึ่งผู้ทดสอบทุกคนชอบรับประทานสตรอเบอรี่ และทราบถึงลักษณะโดยทั่วไปของผลสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทานเบอร์ 70 การประเมินคุณภาพของผลสตรอเบอรี่จะใช้บุคคลเดิมในการประเมินตลอดการทดลอง

8. การประเมินความสดของกลีบเลี้ยง วัดจากความเต่งและสีเขียว โดยใช้ดัชนีจาก 1-5 ดังนี้ (ดัดแปลงจากดนัย, 2544)

1 = สีน้ำตาลและเหี่ยว
2 = สีเหลืองและเหี่ยว
3 = สีเขียวอมเหลืองและเหี่ยว
4 = สีเขียวและเริ่มเหี่ยว
5 = สีเขียวและสด

9. การประเมินด้านรสชาติ โดยใช้ผู้ชิมเป็นแบบ panel test จำนวน 5 คน แล้วให้ระดับคะแนน ดังนี้ (ดนัย, 2544)

9.1. ระดับคะแนนด้านกลิ่น

1 = ไม่มีกลิ่น
2 = กลิ่นหอมน้อย
3 = กลิ่นหอมปานกลาง
4 = กลิ่นหอมมาก

9.2. ระดับคะแนนด้านรสชาติ

1 = รสเปรี้ยว
2 = รสเปรี้ยวอมหวาน
3 = รสหวานอมเปรี้ยว
4 = รสหวาน

10. การยอมรับในการบริโภค โดยใช้ผู้ชิมเป็นแบบ panel test จำนวน 5 คน แล้วให้ระดับคะแนนดังนี้ (ดนัย, 2544)

1 = ไม่ชอบ
2 = ไม่ค่อยชอบ
3 = เฉย ๆ
4 = ชอบ
5 = ชอบมาก

11. อายุการเก็บรักษา เมื่อผลสตรอเบอรี่ผลแรกเริ่มแสดงอาการของโรคหรือเกิดการเน่าเสีย ถือว่าหมดอายุการเก็บรักษา

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่ เดือนมกราคม 2544 ถึงเดือนพฤษภาคม 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University