บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

กระดาษเคลือบพลาสติก 1 ด้าน(กระดาษห่ออาหาร)

เครื่องวัดสี Hunter's colorimeter model CR-200 ของ Minolta

เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer ของ ATAGO)

เครื่องไตเตรท Brikman digital buret

เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (Metex Hunter Spring LKG6-10 1kg/div)

เครื่องชั่ง digital 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

ตู้อบลมร้อน รุ่น D 06061Model 500

กล้องจุลทรรศน์

Haemacytometer Clay-Adams

เครื่องระเหยความดันไอต่ำ (rotary evaporator) Buchi R-124

spectophotometer ของ LABOMED รุ่น specctro23

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

ฐานเคลือบเพลท

ชุดต้มกลั่น

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลาย

ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)

เมธานอล (methanol)

อะซิโตน (acetone)

เอธานอล (ethanol)

เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate)

เฮกเซน (hexane)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีอื่น ๆ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)

ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)

แมกนีเซียซัลเฟต (magnesium sulfate)

ซิลิกาเจล 60

tween –20

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Yeast Agar (MYA)

วิธีการทดลอง

เตรียมมะม่วงโดยการห่อผลมะม่วงที่มีอายุประมาณ 45 วัน ด้วยกระดาษเคลือบพลาสติก 1 ด้าน แกะกระดาษที่ห่อผละมะม่วงออกเมื่อผลมีอายุ 90 วัน และแกะออกทุก 5 วัน จะกระทั่งเก็บเกี่ยว

ตรวจสอบคุณภาพของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวแล้ว 5 วัน

1. พื้นที่สีแดง (เปอร์เซ็นต์) ประเมินด้วยสายตาเปรียบเทียบกับภาพบนกระดาษกราฟ

2 วัดความเข้มของพื้นที่ที่เป็นสีแดงจากส่วนที่เข้มที่สุด และส่วนที่ไม่ใช่สีแดง โดยวัดสีส่วนใหญ่ในผลมะม่วง ด้วยเครื่องวัดสี Chromameter ค่าที่ได้จากเครื่องวัดแสดงเป็น 3 ค่า คือ L*, a* และ b*

L* = The lightness factor (value)

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

หากค่า L* มีค่าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ และ ใกล้ 100 หมายถึงวัตถุมีความสว่างมาก

หากค่า a* มีค่าใกล้ –60 หมายถึงวัตถุมีสีเขียวมาก และใกล้ +60 จะมีสีแดงมาก

หากค่า b* มีค่าใกล้ –60 หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงินมาก และใกล้ +60 จะมีเหลืองมาก

หากค่า a* และ b* ที่ได้มีค่าเท่ากับ 0 หมายถึงวัตถุที่นำมาวัดมีสีเทา

นำค่า a*, b* ที่ได้มาหาค่า Hue angel และค่า Chroma

Hue angle ($h° = \arctan b^*/a^*$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hue angle เป็นค่าแสดงสีต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา โดย

0-45 องศาเป็นสีม่วงแดง ถึง ส้มแดง

45-90 องศา เป็นสีส้มแดง ถึง สีเหลือง

90-135 องศา เป็นสีเหลือ ถึง สีเหลืองปนเขียว

135-180 องศา เป็นสีเหลืองปนเขียว ถึง สีเขียว

180-225 องศา เป็นสีเขียว ถึง สีน้ำเงินปนเขียว

225-270 องศา เป็นสีน้ำเงินปนเขียว ถึง สีน้ำเงิน

270-315 องศา เป็นสีน้ำเงิน ถึง สีม่วง

315-360 องศา เป็นสีม่วง ถึง สีม่วงแดง

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

ค่า Chroma เป็นค่าแสดงความเข้มและจางของวัตถุ มีค่า 0-60

3. วัดสีเนื้อมะม่วง ด้วยการเฉือนผลมะม่วงในบริเวณที่ใกล้เมล็ดออกให้เรียบที่สุด และวัดสีในส่วนที่ไม่มีเมล็ดติดอยู่

4. วัดคุณภาพทางเคมีของผลมะม่วง

4.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid, TSS) วัดจากน้ำคั้นที่ได้จากมะม่วงด้วย hand refractometer ค่าที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์

4.2 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable Acidity, TA) โดยคั้นน้ำมะม่วง 2 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลาย NaOH มาตรฐาน (0.1N) ใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรทจนเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำปริมาณ NaOH ที่ไตเตรทได้คำนวนหาปริมาณกรด ดังนี้

$$\%TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH(0.1N)xปริมาตร NaOH ที่ใช้(ml)x0.064*x100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นจากมะม่วง (ml)}}$$

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

4.3 หาปริมาณแอนโทไซยานิน (Raganna,1977) วิธี estimation of total anthocyanin method ทำได้โดยการ

4.3.1 นำเปลือกมะม่วงชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 5 กรัมหั่นเป็นชิ้นเล็ก ใส่ลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2 ใส่สารละลาย ethanolic HCL (เตรียมจาก 95% ethanol และ 1.5 HCl ในอัตราส่วน 85:15 v/v)125 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยอลูมิเนียมฟลอย

4.3.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

4.3.4 นำสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย ethanolic HCl

4.3.5 นำสารละลายที่ได้วัดค่า absorbance ที่ค่าความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรโดยใช้ ethanolic HCl เป็น blank ค่าที่อ่านได้คำนวณเป็นปริมาณของแอนโทไซยานินดังนี้

$$\text{Total absorbance (Total Ab)} = \text{OD at 535nm} \times \frac{\text{(final volumn)}}{\text{weight(g)}} \times 100$$

$$\text{Total anthocyanin} = \frac{\text{Total Ab}}{98.2}$$ มีหน่วยเป็น mg/100g fresh weight

4.4 ความแน่นเนื้อ (firmness) ด้วยเครื่อง firmness tester (Metex Hunter spring model LKG –10 1kg/div) หัวเจาะขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร กดผ่านส่วนที่นูนที่สุดของมะม่วงที่ลอกเปลือกแล้ว นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

4.5 น้ำหนักแห้ง หั่นมะม่วงเป็นชิ้นเล็กใส่ในถ้วยอลูมิเนียม ชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 20 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องซาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

$$\text{คำนวณหาน้ำหนักแห้งที่เหลืออยู่ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักที่เหลือหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

5. ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

5.1 รสชาติ

0-ผิดปกติ

1-จืด

2-เปรี้ยว

3-หวานอมเปรี้ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4-หวานน้อย

5-หวานปานกลาง

6-หวานมาก

5.2 กลิ่น

0-ผิดปกติ

1-กลิ่นดิบ

2-ไม่มีกลิ่น

3-กลิ่นสุกเล็กน้อย

4-กลิ่นสุกมาก

5.3 เนื้อสัมผัส

0-กรอบมาก

1-กรอบปานกลาง

2-กรอบเล็กน้อย

3-นิ่มเล็กน้อย

4-นิ่มปานกลาง

5-นิ่มมาก เละ

5.4 การยอมรับ

1-ไม่ชอบมากที่สุก

2-ไม่ชอบมาก

3-ไม่ชอบปานกลาง

4-ไม่ชอบเล็กน้อย

5-เฉยๆ

6-ชอบเล็กน้อย

7-ชอบปานกลาง

8-ชอบมาก

9-ชอบมากที่สุด

6. การเกิดโรคเมื่อปลูกเชื้อ

6.1 เตรียมสารละลายแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา (spore suspension) โดยการเทน้ำกลั่นลงไปภายในจานอาหาร MYA ที่มีเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งผลิตสปอร์สีส้ม ใช้ loop ลูบเบาๆ ให้ทั่วเพื่อให้สปอร์หลุดออกมาในน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรองสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่ได้ด้วยผ้าขาวบางเพื่อเอาเส้นใยของเชื้อราและเศษวุ้นที่อยู่ในสารละลายออก เติม tween 20 (polyozyetsylenesorbitan monolaurat) 1 หยด เพื่อให้สปอร์กระจายตัวได้ดีขึ้น นับสปอร์ให้ได้ 1x 10^6 สปอร์/ มิลลิลิตร ด้วย haemacytometer

6.2 นำมะม่วงทั้ง 3 กรรมวิธี วิธีละ 10 ผล ล้างให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำมาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และทิ้งไว้ให้แห้ง จุ่มผลมะม่วงลงในสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่เตรียมไว้จากข้อ 6.1 นำผลมะม่วงที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้วใส่ในตะกร้า หุ้มด้วยถุงพลาสติกที่มีกระดาษหรือสำลีชุบน้ำจนชุ่ม มัดถุงและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จึงนำผลมะม่วงออกมาเพื่อจดบันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคด้วยสายตาเปรียบเทียบกับพื้นที่บนกระดาษกราฟ

6.3 ความเสียหายจากโรคในระยะวางจำหน่าย สุ่มผลมะม่วงที่ได้รับแสงจากระยะเวลาต่างกัน 3 ชุด ชุดละ 18 ผล วางไว้ที่อุณหภูมิห้องตรวจสอบความเสียหายที่เกิดขึ้นกับมะม่วงเมื่อเก็บรักษา 9 วัน (วิทวัส, 2545) จดบันทึกและประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้นกับมะม่วง

7. หาสารต้านทานเชื้อโรคด้วยวิธี TLC bioassay และเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ

7.1 การสกัดสารจากผิวมะม่วง ปอกเปลือกมะม่วงหนาประมาณ 2 มิลลิเมตรทั่วทั้งผล หั่นให้ละเอียดแล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ 250 กรัม ใส่ลงในเครื่องบด พร้อมกับเติม เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็น โดยใช้อัตราส่วนเอทธานอล 150 มิลลิลิตรต่อเปลือกมะม่วง 50 กรัม บดด้วยเครื่องให้ละเอียดที่สุด ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง กรองเพื่อเอาสารละลายออกจากกากมะม่วง นำสารละลายที่ได้มาระเหยด้วย evaporator ภายใต้ความดันต่ำให้เหลือปริมาตรเป็น 1 ใน 3 ของสารละลายเอทธานอลเริ่มต้น

นำสารที่ได้ใส่ในกรวยแยก เติมไดคลอโรมีเทน ปริมาณเท่ากับเอทธานอลที่เหลือ เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แยกสารละลายส่วนล่างคือไดคลอโรมีเทนออกเก็บไว้ เติมไดคลอโรมีเทนลงในสารละลายชั้นบนอีกครั้ง เขย่าและตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น แยกสารละลายส่วนล่างไว้รวมกับสารที่แยกไว้ครั้งแรก เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเพื่อกำจัดน้ำภายในสารละลาย กรองเอาแมกนีเซียมซัลเฟตออกด้วยกระดาษกรอง นำสารที่ได้มาระเหยเพื่อเอาไดคลอโรมีเทนนออกจนแห้ง ใช้ไดคลอโรมีเทนเล็กน้อยละลายสารสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกมาเก็บไว้ในขวดตัวอย่าง แล้วเก็บในตู้แช่แข็ง เรียกสารที่ได้ว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)

7.2 การเตรียมแผ่น TLC plates นำแผ่นกระจกใสที่ล้างสะอาดแล้ววางบนฐานเคลือบเพลท เช็ดแผ่นกระจกด้วยอะซิโตนเพื่อขจัดคราบและสิ่งสกปรกอื่นที่ติดอยู่บนแผ่นกระจก ยึดเพลทให้ติดกับฐาน ชั่งซิลิกาเจล (60GE-Merck) 60 กรัม ต่อน้ำ 120 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในขวดรูปชมพู่จนเป็น suspension เทส่วนที่ได้ลงใน applicator ใช้ความหนา 1 มิลลิเมตร รอให้แห้ง และนำไปอบจนแห้งสนิท

7.3 การแยกส่วนประกอบของสารสกัดหยาบ หยดไดคลอโรมีเทนลงในขวดสารสกัดหยาบเล็กน้อย เขย่าเบาจนสารสกัดหยาบละลาย ใช้หลอดแคปิลารี หยดสารลงในเพลททีละหยดเป็นแนวเดียวกัน ห่างจากขอบกระจกประมาณ 2.5 เซนติเมตร รอให้แห้งแล้วหยดซ้ำ รอให้แห้งสนิท นำเพลทที่ได้ในลงใน tank ที่มีไอของสารละลาย n-hexane, ethyl acetate, methanol อัตราส่วน 60:40:1 ซึ่งอิ่มตัวด้วยการใช้กระดาษกรองจุ่มในสารละลาย ปิดฝา tank ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ใส่เพลทลงใน tank รอให้สารละลายเคลื่อนที่จนถึงระยะที่กำหนดจึงนำเพลทออกมา นำเพลทไปไว้ในตู้ดูดควันประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อให้สารละลายระเหยจนหมด

7.4 หาส่วนที่สารสามารถยับยั้งเชื้อรา เทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหาร *Colletotrichum gloeosporioides* และเชื้อ *Cladosporium cladosporioides* อายุ 5 – 7 วัน ที่สร้าง สปอร์ใช้ loop เขี่ยเบาๆ บนผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์กระจายตัว นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิดกรองผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำเส้นใยและวุ้นที่ติดอยู่ในสารแขวนลอยออก นับสปอร์ให้ได้ 25×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติม tween 20 จำนวน 1 หยด เพื่อให้สปอร์เชื้อรากระจายตัวเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตมา 1 มิลลิลิตร นำไปนับจำนวนสปอร์เชื้อราให้ได้ 25×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร แล้วนำอาหารเหลว PDB เจือจางสารแขวนลอยของสปอร์อีกครั้งโดยใช้อัตราส่วนระหว่างสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราต่อ PDB เท่ากับ 1 ต่อ 5 ฉีดสารแขวนลอยของเชื้อราที่เตรียมได้ลงบนเพลท แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน หาค่า Rf ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.5 หาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เจือจางสารสกัดหยาบที่ได้จากแต่ละกรรมวิธีด้วยไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1,000 g/l ใน vial หยดสารสกัดหยาบ แต่ละความเข้มข้นที่เตรียมได้ครั้งละ 20 ไมโครลิตร ลงในเพลทที่เคลือบซิลิกาเจลที่ขีดแบ่งช่องไว้ รอให้แห้ง ฉีดสารละลายแขวนลอยของสปอร์ลงไปแล้วบ่ม หาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้โดยดูจากขนาดของบริเวณยับยั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved