บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของโอโซนต่อการควบคุมโรคของลำไยหลังการเก็บเกี่ยว

1.1 การเกิดโรคของผลลำไยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C

จากการทดลอง การเก็บรักษาผลลำไยที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าชุดควบคุมหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน โดยแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Whangchai (2005) พบว่าการรมผลลำไยสดด้วยก๊าซโอโซนเป็นระยะเวลา 60 นาที สามารถลดการเกิดโรคระหว่างการเก็บรักษาได้ดี นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการรมลำไยด้วยก๊าซโอโซนเพื่อควบคุมเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Lasiodiplodia* sp. และ *Cladosporium* sp. ที่ถูกเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยรมเป็นเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที พบว่าการรมเป็นเวลา 60 นาที สามารถลดการเจริญของ mycelial ของ *Lasiodiplodia* sp. และสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ *Cladosporium* sp. ได้ ซึ่งโอโซนเป็นสารออกซิไดส์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งกลไกในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ คือ ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยตรงกับผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบภายในเซลล์ (cell lysis) เช่นเดียวกับ Ishizaki *et al.* (1987) พบว่าโอโซนมีการซึมผ่านผนังเซลล์แล้วทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ใน cytoplasm ทำให้แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์ลดลง เนื่องจากสาเหตุต่างๆ ที่โอโซนมีผลต่อการทำลายเชื้อรา โดยอาจมีผลในการออกซิไดส์เซลล์เมมเบรนของเชื้อราให้ได้รับความเสียหาย จากการทดลอง Sarig *et al.* (1996) พบว่าโอโซนอาจกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคโดยการสร้างสารที่เรียกว่า phytoalexin เช่น reversital และ pterostilbene ทำให้การเข้าทำลายของเชื้อเกิดขึ้นน้อย นอกจากนี้ Rusch and Laurence (1993) ได้ศึกษาผลของโอโซนต่อโรค powdery mildew ในถั่ว (*Pisum sativum*) 2 สายพันธุ์ คือ Alaska และ Bounty ที่ปลูกในโรงเรือนที่ควบคุมสภาพบรรยากาศและอุณหภูมิ โดยให้โอโซน 0, 0.06 และ 0.12 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง/วัน โดยรมทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อ ด้วย conidia ของ *Erysiphe polygoni* f. sp. Pisi. พบว่าโอโซนที่ความเข้มข้น 0.12 ไมโครลิตร/ลิตร สามารถควบคุมโรค powdery mildew ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ° C

พบว่าทุกชุดการทดลองจะเริ่มเป็นโรคในสัปดาห์ที่ 3 หลังการเก็บรักษา ยกเว้นชุดที่รมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่พบการเป็นโรคเลยตลอดอายุการเก็บรักษา เช่นเดียวกับการทดลองของ อังคณา (2549) ที่ได้ทำการศึกษาในผลลำไยซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C พบว่าในช่วง 1 - 2 สัปดาห์แรกไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนและชุดที่แช่กรดอินทรีย์ร่วมกับโอโซน เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ให้ต่ำลงได้ ทำให้เปลือกผลลำไยพบการเข้าทำลายของโรคน้อยลง ดังการศึกษาในผลอะโวคาโดพันธุ์ Hass พบว่าการเก็บรักษาผลที่อุณหภูมิ 6 - 8 °C มีการเกิดโรคลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 °C (Woolf *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาครั้งนี้ในสัปดาห์ที่ 3 เริ่มปรากฏเชื้อราในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดที่รมด้วยซัลเฟอร์-ไดออกไซด์ เนื่องจากคุณสมบัติของโอโซนที่สามารถออกซิไดส์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ แต่หลังจากนั้นมีการสลายตัวไปเป็นก๊าซออกซิเจนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นหลังจากที่ให้โอโซนควรมีการระมัดระวังและการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ จะทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ของโอโซนดียิ่งขึ้น โดยชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน และรูปแบบของโปรตีนของเปลือกและเนื้อลำไย

2.1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน โดยวิธี dye binding

2.1.1 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนเมื่อเก็บรักษาลำไยที่อุณหภูมิ 27 °C

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนเปลือกลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าชุดรมด้วยก๊าซโอโซนมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ส่วนชุดควบคุมและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกับ Lurie and Klein (1991) พบว่าผลมะเขือเทศที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 4 และ 12 ชั่วโมง มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนเท่ากับ 3,300 และ 20,100 หน่วย/นาที ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าชุดควบคุมที่มีปริมาณการสังเคราะห์โปรตีนเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 4 และ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 6,560 และ 48,300 หน่วย/นาที ตามลำดับ การที่มีการสังเคราะห์โปรตีนลดลงเป็นการตอบสนองของพืชอันเนื่องมาจากความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิสูงเช่นเดียวกับการทดลองนี้ที่ได้รับโอโซนซึ่งเป็นความเครียดอย่างหนึ่งที่อาจไปออกซิไดส์และทำให้โมเลกุลของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง โดยเกิดการแตกหักของสาย peptide หรืออาจจะเกิดการรวมตัวของผลผลิตจากปฏิกิริยาของโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ (Farr and Kogaoma, 1991) ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง นอกจากนี้ Larrigaudiere *et al.* (2004) ยังพบว่าปริมาณโปรตีนมีความสัมพันธ์กับการเกิดความเครียด โดยโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งโดยทั่วไปสิ่งมีชีวิตมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากถึงประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้ง โปรตีนสามารถทำหน้าที่ได้หลายอย่าง ได้แก่ เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของเซลล์ เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆ ซึ่งกระบวนการทางชีวเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นสารโปรตีนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทั้งสิ้น (ไพโรจน์, 2538)

ส่วนการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในเนื้อลำไย พบว่าทุกชุดการทดลองปริมาณโปรตีนในเนื้อลำไยหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน มีค่าไม่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่สามารถแทรกซึมผ่านเปลือกเข้าไปถึงเนื้อลำไยได้เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของเปลือกลำไยเอง โดยจากการศึกษาของ สมคิดและคณะ (2549) พบว่าผิวของเปลือกลำไย มีคิวติเคิลบางๆ ปกคลุม มีขน (trichomes) และปากใบ (stomata) กระจายเป็นกลุ่มบนผิวเปลือกลำไย เมื่อตัดตามขวางและดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ SEM และ TEM พบว่าความหนาของเปลือกลำไยพันธุ์ดออยู่ในช่วง 518 - 644 (เฉลี่ย 575) ไมโครเมตร สามารถแบ่งชั้นของเปลือกตามรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ได้เป็น 3 ชั้น ซึ่งแยกกันอย่างไม่ชัดเจน คือ เปลือกชั้นนอก (exocarp) ประกอบด้วยชั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คิวติเคิลอิพิเดอมิสที่มีเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ 2 - 3 ชั้นเซลล์ เปลือกชั้นกลาง (mesocarp) มีความหนาประมาณ 70% ของความหนาของเปลือกทั้งหมด พบเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน คือ พบทั้งรูปร่างยาวรีและค่อนข้างกลม, stone cell, กลุ่มท่อน้ำท่ออาหาร และมีช่องว่างระหว่างเซลล์ขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป ส่วน stone cell มีผนังเซลล์หนา เปลือกชั้นใน (endocarp) เป็นเซลล์รูปร่างสี่เหลี่ยมจัตุรัสชั้นเดียวเรียงตัวต่อกันอย่างเป็นระเบียบ

2.1.2 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนเมื่อเก็บรักษาลำไยที่อุณหภูมิ 5 °C

จากการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในเปลือกลำไย พบว่าชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเปลือกผลลำไยน้อยกว่าชุดควบคุมโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซน พบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมดลดลง อาจเนื่องจากโอโซนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เช่นเดียวกับ Whangchai *et al.* (2006) พบว่าโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ลดลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยโอโซนเป็นสารออกซิไดส์ที่มีประสิทธิภาพอาจไปทำให้โมเลกุลของกรดอะมิโนเปลี่ยนรูปไปหรือการเกิดการแตกหักของ peptide chian (Farr and Kosama, 1991) เช่นเดียวกับซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะไปลดการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยจะไปจับกับทองแดงทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไม่ได้ (Son *et al.*, 2001) นอกจากนี้ การให้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิต่ำทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงมากกว่าเดิม เช่นเดียวกับ สมคิดและคณะ (2549) พบว่าปริมาณโปรตีนในเปลือกลำไยลดลงเมื่อเก็บรักษาที่ 5 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90±1% อาจเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับการเกิดความเครียด เมื่อพืชได้รับความเครียด เช่นอุณหภูมิที่ลดลงทำให้เอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการต่างๆ อาจมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป จนทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ได้ (Larrigaudiere *et al.*, 2004)

ส่วนการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในเนื้อลำไย พบว่าทุกชุดการทดลองมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเนื้อผลลำไยไม่แตกต่างกันเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 รูปแบบของโปรตีน โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตโฟรีซิส (SDS polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบโปรตีนที่เปลือกและเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C

ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีจำนวนแถบน้อยกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 29.9, 54.5, 177.5 และ 300 กิโลดาลตัน ซึ่งจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง gel logic 100 imaging system ชุดควบคุมไม่มีการสลายตัวของโปรตีนในเปลือกลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C เนื่องจากกระบวนการเสื่อมสลายอาจเกิดหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น เช่นเดียวกับ วีรพล (2546) ทำการศึกษาแถบโปรตีนในการแช่มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 °C นาน 30, 45, 60 และ 75 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90 - 95% เป็นเวลา 24 วัน พบว่าแถบโปรตีนที่เห็นชัดเจนจำนวน 36 แถบ ในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยในวันเริ่มต้นของการเก็บรักษาพบแถบโปรตีนหลัก 18 แถบในชุดควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักระหว่าง 16.36 - 104.32 กิโลดาลตัน แต่ผลมะม่วงที่แช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 60 และ 75 นาที มีแถบโปรตีนหลักน้อยกว่าชุดควบคุม 1 แถบ ซึ่งเป็นแถบโปรตีน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25.11 - 26.84 กิโลดาลตัน เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 16.06 - 16.36 กิโลดาลตัน ในทุกชุดการทดลอง และปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23.28 - 24.01 กิโลดาลตัน ในผลมะม่วงชุดควบคุม และที่แช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 และ 45 นาที เท่านั้น ซึ่งคาดว่าการได้รับอุณหภูมิสูงขึ้น หรือการได้รับอุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานขึ้นมีผลทำให้เกิดการสลายตัวหรือเปลี่ยนรูปของโปรตีนบางชนิด จากผลการทดลองนี้ที่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนบางแถบเมื่อเก็บรักษาผลลำไยเป็นระยะเวลานานขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง gel logic 100 imaging system นั้น อาจเกิดจากการที่โปรตีนมีการสลายตัวหรือเปลี่ยนรูปไปเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กหรือเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอิสระ (จริงแท้, 2542) หรืออาจมีการกระตุ้นให้สร้างโปรตีนบางชนิด เช่น heat shock protein เช่นเดียวกับ Sabehat *et al.* (1996) ที่รายงานว่าผลมะเขือเทศที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 48 ชั่วโมง มีการสังเคราะห์ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน และโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 18 - 21 กิโลดาลตัน และพบว่าผลมะเขือเทศที่ได้รับอุณหภูมิดังกล่าวแสดงอาการสะท้านหนาวน้อยกว่าผลมะเขือเทศชุดควบคุม จึงเชื่อว่า HSPs ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่เหมือน molecular chaperone ที่จับกับโปรตีนที่เสียสภาพเนื่องจากสภาพเครียดต่างๆ แล้วทำให้เกิดการรวมตัวสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นโปรตีนที่สมบูรณ์อีกครั้ง และช่วยป้องกันการรวมตัวที่ผิดระเบียบของโปรตีน ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะช่วยป้องกันความเสียหายที่เกิดกับโปรตีนภายในเซลล์และโปรตีนที่เกี่ยวกับเยื่อหุ้ม ดังนั้น HSPs จึงสามารถเพิ่มความทนทานของเนื้อเยื่อพืชต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวเมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามในพืชบางชนิดหากได้รับอุณหภูมิสูงมากเกินไปจะทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลงได้ Woolf *et al.* (1995) รายงานว่าผลสาลี่ที่ได้รับอุณหภูมิสูงจะมีการสังเคราะห์ heat shock proteins (HSPs) ลดลงโดยไปทำให้ mRNA เกิดการสลายตัว ทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง

ส่วนรูปแบบของโปรตีนในเนื้อผลลำไย พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก

2.2.2 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบโปรตีนที่เปลือกและเนื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C

ส่วนการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนที่เปลือกเมื่อเก็บรักษาที่ 5 °C ชุดที่รมก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไม่ปรากฏแถบที่ 1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 405.8 กิโลดาลตัน และมีการสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30 กิโลดาลตัน ขึ้นมา อาจเป็นเพราะโปรตีนที่เสียสภาพเนื่องจากสภาพเครียดต่างๆ แล้วทำให้เกิดการรวมตัวสร้างเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์อีกครั้ง และช่วยป้องกันการรวมตัวที่ผิดระเบียบของโปรตีน ส่วนโปรตีนที่มีน้ำหนักต่ำจะช่วยป้องกันความเสียหายที่เกิดกับโปรตีนภายในเซลล์และโปรตีนที่เกี่ยวกับเยื่อหุ้ม (Sabehat *et al.*, 1996) จึงสามารถเพิ่มความทนทานของเนื้อเยื่อพืชต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวเมื่อนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำได้ หรือการใช้ความร้อนช่วยป้องกันการสะท้านหนาวโดยการชักนำให้มีการสังเคราะห์ HSPs ระหว่างที่ได้รับความร้อนโดย HSPs ช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับโปรตีนที่เกี่ยวกับเยื่อหุ้ม และยังช่วยป้องกันเอนไซม์และโปรตีนไม่ให้เสียหายหรือหยุดการทำงานขณะที่เก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำ ส่วนในเนื้อผลไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนมากนัก เช่นเดียวกับ ศิริโสภา (2546) พบว่าการใช้ความร้อนไม่มีผลต่อจำนวนแถบโปรตีนในเปลือกลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 12 วัน พบจำนวนแถบโปรตีน 18 แถบ เหมือนเดิมในทุกชุดการทดลอง

จากการทดลองนี้อุณหภูมิต่ำระหว่างการเก็บรักษาไม่ได้ทำให้จำนวนแถบโปรตีนแตกต่างจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C มากนัก ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C ในผลลำไยไม่มีผลต่ออาการสะท้านหนาวของผลลำไย ดังนั้นการสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นการป้องกันตัวเองจากความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิต่ำจึงเกิดขึ้นได้น้อยเช่นเดียวกับ ศิริโสภา พบว่าการแช่ผลลำไยที่อุณหภูมิ 40 - 45 °C เป็นเวลา 5 - 30 นาที ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโปรตีนเปลือกเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพราะการใช้ความร้อนช่วยป้องกันอาการสะท้านหนาวโดยการชักนำให้มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสังเคราะห์ HSPs ระหว่างที่ได้รับความร้อนโดย HSPs ช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับโปรตีนที่เกี่ยวกับเยื่อหุ้ม และยังช่วยป้องกันเอนไซม์และโปรตีนไม่ให้เสียหายหรือหยุดการทำงานขณะที่เก็บรักษาผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบแอนตีออกซิแดนซ์ของเปลือกและเนื้อลำไยหลังจากได้รับโอโซนระหว่างการเก็บรักษา

3.1 ปริมาณ peroxides ทั้งหมด โดยใช้วิธี titanium method (Brennan and Frenkel, 1977)

3.1.1 ปริมาณ peroxides ทั้งหมดในเปลือกและเนื้อลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C

โดยการทดลองนี้ พบว่ามีปริมาณ peroxides ทั้งหมดในเปลือกผลลำไยมากกว่าในเนื้อทุกชุดการทดลอง โดยมีปริมาณ peroxides ทั้งหมดหลังจากรมด้วยก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์-ไดออกไซด์มีค่ามากกว่าและหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ชุดควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่ามากกว่าชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ปริมาณ peroxides ทั้งหมดจัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ซึ่งความเครียดมีผลทำให้มีการสร้าง peroxides ทั้งหมดเพิ่มขึ้น (Omran, 1980) โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น reactive oxygen species และมีพิษอย่างมากต่อเซลล์พืช (MacRae and Ferguson, 1985) โดยมีคุณสมบัติเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่แรงจึงสามารถเป็นตัวเริ่มต้นของความเสียหายที่เกิดจากการออกซิเดชันนำไปสู่การทำลายสมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ และทำให้เซลล์ในบริเวณที่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เสียสภาพในที่สุด ซึ่งการสะสมปริมาณ peroxides ทั้งหมด นอกจากจะเป็นพิษต่อเซลล์แล้วยังอาจจะทำให้เกิดออกซิเดชันของหมู่ sulfhydryl ที่มีผลต่อเอนไซม์หลายชนิดใน Calvin cycle (Scandalios, 1993) อีกทั้งสามารถรวมตัวกับอิออนของ superoxide เกิดเป็น hydroxyl radical ซึ่งสามารถทำให้เกิดการออกซิเดชันของลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Omran, 1980) แต่หลังจากผลลำไยได้รับก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์มีปริมาณ peroxides ทั้งหมดลดลงตลอดเวลาการเก็บรักษาอาจเนื่องจากโอโซนอาจกระตุ้นให้พืชสร้างสารที่สามารถกำจัด peroxides ได้ เช่นเดียวกับ ลดาศิริ (2542) ได้ศึกษาการให้ความร้อนกับผลมะละกอที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C พบว่าสามารถชะลอการเกิดอาการสะท้านหนาวได้ โดยสัมพันธ์กับปริมาณ peroxides ทั้งหมดที่ลดลง นอกจากนี้การทดลองในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองซึ่งอ่อนแอต่อการเกิดอาการสะท้านหนาว จะพบว่ามีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าพันธุ์ปัตตาเวียที่ทนทานต่อการเกิดอาการสะท้านหนาว (Omarun and Siripanich, 2004)

ส่วนในเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณ peroxides ทั้งหมดมากนัก เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดและปริมาณ peroxides เกิดในเนื้อผลของลำไยซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกเข้าไปและเปลือกที่หนาจนไม่สามารถก่อให้เกิดความเสียหายแก่เนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อที่อยู่ลึกเมื่อได้รับโอโซนมีโอกาสเกิดอนุมูลอิสระน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพราะมีสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีกระบวนการที่เกี่ยวกับออกซิเจน ดังตัวอย่างที่พบจากการทดลองของ Kitagawa *et al.* (2004) พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีปริมาณต่ำเมื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของ porcine ในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ

3.1.2 ปริมาณ peroxides ทั้งหมดในเปลือกและเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C

ปริมาณ peroxides ทั้งหมดในเปลือกผลลำไยของชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ peroxides ทั้งหมดทันทีก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C พบว่ามีปริมาณมากกว่าชุดควบคุมโดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ peroxides ทั้งหมดของชุดควบคุมมีค่าประมาณ 5 เท่าจากวันเริ่มต้น ในขณะที่ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ซึ่งอุณหภูมิต่ำมีผลกระตุ้นการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มมากขึ้น (Foyer *et al.*, 1997) เช่นเดียวกับการทดลองของ Wohlgemuth *et al.* (2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณอนุมูลอิสระในพืชหลายชนิดในพืชหลายชนิด พบว่าพืชแต่ละชนิดเมื่ออยู่ในสภาพเครียดจะมีการสะสมอนุมูลอิสระในรูปของ $O_2^{-\bullet}$ รวมถึงมีรายงานการเพิ่มขึ้นของ $OH^{\bullet}$ เช่น ในใบมันฝรั่งที่อยู่ในสภาวะเครียด (Beligni and Lamattina, 2002) เป็นต้น หรืออาจจะเนื่องมาจากในสภาวะปกติไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะค่อนข้างเสถียรและไม่มีพิษต่อเซลล์ แต่จะเปลี่ยนเป็นเข้าทำลายเซลล์เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสภาพเครียดภายนอก ซึ่งการเพิ่มของปริมาณ peroxides ทั้งหมดในชุดควบคุมของการทดลองนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิด senescence ของผลลำไยเอง เช่นเดียวกับการทดลองของ Brennan and Frenkel (1977) พบว่าในผลสาลี่จะมีปริมาณ peroxides ทั้งหมดเพิ่มขึ้นในขณะที่เกิด senescence และจะกระตุ้นให้เกิดการสุกเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยในพืชจะพบ peroxides อยู่แล้ว แต่เมื่อเกิด senescence จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะเมื่อพืชได้รับความเครียด ดังนั้นการให้โอโซนจากการทดลองนี้ก็จะทำให้ปริมาณ peroxides ทั้งหมดเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน

ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (5 °C) ต่อปริมาณ peroxides ทั้งหมดของเนื้อผล พบว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อปริมาณ peroxides น้อยมาก

3.2 ปริมาณกรดแอสคอร์บิก

3.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอสคอร์บิกของเปลือกและเนื้อลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C

ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในเปลือกผลลำไยของทุกชุดการทดลอง พบว่ามีปริมาณลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา โดยเฉพาะลำไยที่ได้รับก๊าซโอโซนและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งกรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอสคอร์บิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่ช่วยป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระ โดยการเข้าจับและทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ (Galaris and Korantzopoulos, 1997)

กรดแอสคอร์บิก + ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ⟶ dehydroascorbate + น้ำ 2 โมเลกุล

โดยปริมาณแอสคอร์บิกจากการทดลองนี้ลดลงโดยไม่สัมพันธ์กับปริมาณ peroxides ที่ลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Ariel *et al.* (2006) ที่ได้ศึกษาในสตรอเบอรี่เมื่อให้ความร้อน (heat-treated) อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 0, 7 และ 14 วัน และนำไปเก็บไว้ที่ 20 °C เป็นเวลา 2 วัน พบว่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกมีปริมาณมากกว่าชุดควบคุม เช่นเดียวกับ Mkret *et al.* (2006) พบว่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกจะเพิ่มขึ้นเมื่อต้นเมลอนได้รับความเครียดจากความเค็ม ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนรูปของกรดแอสคอร์บิกในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดอาจจะแตกต่างกัน ทำให้ปริมาณกรดแอสคอร์บิกไม่คงที่แน่นอน ปริมาณกรดแอสคอร์บิกที่มีอยู่ในเนื้อผลขึ้นอยู่กับการสร้างหรือบทบาทของกรดแอสคอร์บิก เช่น กรดแอสคอร์บิกจะให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ ascorbate peroxidase ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Asada, 1992) หรือตัวกรดแอสคอร์บิกเองให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation (Buettner, 1993) หรือกรดแอสคอร์บิกสูญเสียอิเล็กตรอนกรณีเข้าไปรีดิวซ์ *o*-quinones เปลี่ยนกลับไปเป็น *o*-diphenols (Wakayama, 1995) ซึ่งเป็นการลดปริมาณ *o*-quinones ลง ทำให้เกิดปฏิกิริยา polymerization ของ *o*-quinones น้อยลงด้วย เป็นผลให้เกิดอาการสีน้ำตาล (browning) ของเนื้อเยื่อลดลงตามมา (Robards *et al.*, 1999)

3.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอสคอร์บิกของเปลือกและเนื้อลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C

ปริมาณกรดแอสคอร์บิกในชุดควบคุมมีแนวโน้มลดลงทั้งเปลือกและเนื้อ สาเหตุที่ปริมาณกรดแอสคอร์บิกลดลงในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีอยู่หลายประการ เช่น การเปลี่ยนรูปไปภายหลังจากการเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หรือสูญเสียไปกับการทำงานของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) และ polyphenol oxidase (PPO) การรีดิวซ์ quinone และถูกออกซิไดส์ด้วยออกซิเจน เป็นต้น (Foyer, 1993) หรือการลดลงอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด เช่น APX, PPO และ peroxidase ที่มีอยู่ในผลิตผล (จริงแท้, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase

3.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในเปลือกและเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 °C

กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในเปลือกของชุดควบคุมมีแนวโน้มลดลงตลอดเวลาการเก็บรักษา เนื่องจากเอนไซม์ catalase ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยตรงเพื่อให้ได้น้ำและออกซิเจน (Burris, 1993) ดังนั้นการเก็บรักษานานขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ เซลล์มีการเสื่อมสภาพหรือเกิดความเสียหายกับเซลล์ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สัมพันธ์กับการทำงานที่น้อยลงของเอนไซม์ catalase ในขณะที่ชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนมีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของเปลือกลำไยเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ catalase จะถูกชักนำให้สร้างขึ้นและมีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดการต้านทานต่อความเครียด ซึ่งในในกรณีนี้ถือว่าโอโซนเป็นความเครียดของพืชอย่างหนึ่ง ดังเช่นการทดลองของ Sala and Lafuente (2000) พบว่าการให้ความร้อนแก่ผลส้มก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำทำให้ผลส้มมีความต้านทานต่ออุณหภูมิต่ำได้ดี โดยสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และ Sala (1998) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ activated oxygen scaveging ได้แก่ superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase และ glutathione reductase ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ พบว่า catalase สูงขึ้นในพันธุ์ที่ต้านทานต่ออุณหภูมิต่ำ

3.3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในเปลือกและเนื้อผลลำไยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C

ชุดควบคุมมีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ลดลงหลังนำไปเก็บรักษาในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 สำหรับชุดที่รมด้วยก๊าซโอโซนมีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ของเปลือกลำไยค่อยๆ เพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษา จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ ลดาศิริ (2542) ซึ่งศึกษาในผลมะละกอที่ได้รับอุณหภูมิสูงก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ catalase มากกว่าจึงลดอาการสะท้านหนาวได้ดี และยังได้ศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ catalase กับปริมาณ peroxides ทั้งหมด พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในส่วนเปลือกมีความสัมพันธ์กับปริมาณ peroxides ทั้งหมดมากกว่าในเนื้อ ทั้งนี้เนื่องจากว่าปริมาณ peroxides ทั้งหมดในส่วนเปลือกมากกว่าในเนื้อ ซึ่ง Leshem *et al.* (1986) พบว่าสภาวะที่มีปริมาณ peroxides ทั้งหมดที่สูงจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ catalase ในการกำจัด peroxides ได้ดีกว่าสภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์ peroxides ทั้งหมดต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved