บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุพันธุ์พืช

เก็บเกี่ยวผลมังคุดที่ระยะที่ 4 มีผิวมีม่วงแดง 80-90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) หรือผลมังคุดมีอายุประมาณ 40-60 วันหลังจากวันดอกบาน จากสวนเกษตรกรที่ปลูกเป็นการค้าในพื้นที่ อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2552

ภาพที่ 3 ผลมังคุดที่ผิวมีสีม่วงแดง 80-90 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

1. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i/50 หัววัดลูกตุ้มขนาด (p/1S) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

2. เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น EK-600H ของบริษัท AND Company ประเทศญี่ปุ่นชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 600 กรัม และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น HR-200 ของบริษัท AND Company ประเทศญี่ปุ่น ชั่งน้ำหนักได้สูงสุด 210 กรัม

3. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruit firmness tester) รุ่น FHR-1 ของบริษัท Nippon Optical Works ประเทศญี่ปุ่น ขนาด 1 กิโลกรัม หัววัดรูปทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (digital spectrophotometer) รุ่น Spectro 23 ของบริษัท LaboMed ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. เครื่อง Centrifuge รุ่น1610 ของบริษัท Hettich Zentrifugen ประเทศเยอรมัน

6. เครื่องวัดสี (chromameter) รุ่น CR-300 หัววัด CR-310 ของบริษัท Minolta ประเทศญี่ปุ่น วัดหัวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L^*, a^*, b^*, chroma และ hue angle (ภาพที่ 4) โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

ค่า L^* = lightness factor (value)แสดงค่าความสว่าง

- มีค่าเข้าใกล้ 100 แสดงว่าวัตถุมีสีขาว
- มีค่าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีดำ

ค่า $a^* b^*$ = chromaticity coordinates (hue, chroma)

ค่า a^* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b^* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ค่า $a^* b^*$ หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ค่า chroma แสดงความเข้มของสี

- มีค่าเข้าใกล้ 0 เมื่อวัตถุมีสีซีดจาง(เทา)
- มีค่าเข้าใกล้ 60 เมื่อวัตถุมีสีเข้ม

ค่า hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงสีแท้จริงของวัตถุในช่วงมุม 0-360 องศา จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

THETA = (arctangent (b*/a*)/6.2832*360^o)

ถ้า a > 0 และ b > 0; ค่า h° = THETA + 90^o

ถ้า a < 0 และ b > 0; ค่า h° = THETA + 180^o

ถ้า a < 0 และ b < 0; ค่า h° = THETA + 270^o

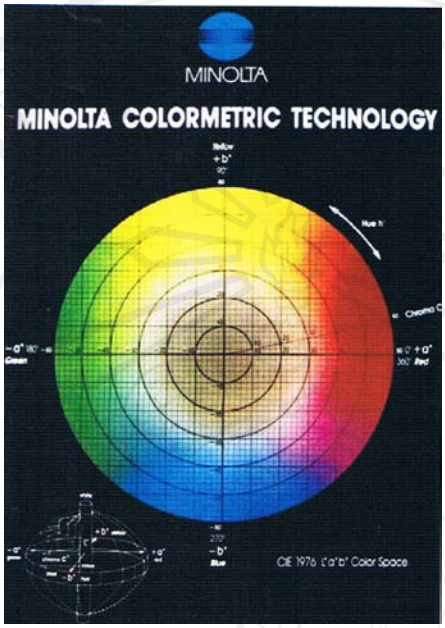
ถ้า a > 0 และ b < 0; ค่า h° = THETA + 360^o

ค่า h° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงส้มแดง	180-122 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน
45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง	225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน
90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงสีเขียว	270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

135-180 องศา แสดงถึงสีเหลืองเขียวถึงเขียว 315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง



ภาพที่ 4 แผนภาพของสีที่อ่านค่าเป็น L*, a* และ b*

7. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาเนื้อเยื่อ

1. เครื่องตัดชิ้นส่วนแบบล้อหมุน rotary microtome (Leitz Wetzlar ของบริษัท Scicrope Instrument CO. IA, U.S.A)
2. กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope พร้อมอุปกรณ์การถ่ายภาพ (Olympus รุ่น PM-30, Olympus Opical CO.Ltd.Tokyo, Japan)
3. ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิเป็น 56 องศาเซลเซียส
4. แผ่นให้ความร้อน hot plate
5. เครื่องอุ่นสไลด์ที่ปรับอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส
6. แท่งไม้สี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5x1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่ต้มให้อิ่มตัวในพาราฟิน
7. แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์
8. อุปกรณ์เครื่องแก้วได้แก่ ขวดสำหรับใส่ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช บีกเกอร์ และขวดย้อมสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ตะเกียงแอลกอฮอล์ พู่กันขนอ่อน ปากคีบ และป้ายติดกาว

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีตัดด้วยมือ (Freehand section)

เป็นการการตัดเนื้อเยื่อของเปลือกมังคุดที่ได้รับแรงกดทับ เพื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องทำได้ดังนี้

1. ใช้ใบมีดโกนที่คมตัดเนื้อเยื่อของเปลือกมังคุดส่วนที่ได้รับแรงกดทับ ให้มีขนาดประมาณ 3 x 5 x 2 มิลลิเมตร โดยตัดลงบนแผ่น เขียงไม้ผิวเรียบขนาดเล็ก นำแผ่นสไลด์ วางทับลงบนชิ้นพืช ให้ชิ้นพืชเหลื่อมพ้นด้านกว้างของ สไลด์ ออกมาเล็กน้อย ใช้มือซ้ายกดทับแผ่น สไลด์เอาไว้ แล้วตัดชิ้นพืชที่พ้นออกมาจากขอบ สไลด์หลาย ๆ ครั้งพยายามตัดให้ได้ชิ้นพืชที่ค่อนข้างบางถึงบางมาก

2. ใช้พู่กันปลายแหลมย้ายชิ้นเนื้อเยื่อเปลือกมังคุดที่ตัดได้ไปวางลงในหยดน้ำ บนสไลด์เพื่อกันไม่ให้ชิ้นเนื้อเยื่อแห้ง จนได้จำนวนชิ้นพืชมากพอ

3. เลือกย้ายชิ้นเนื้อเยื่อเปลือกมังคุดที่ค่อนข้างบางและบางมาก มาวางบน หยดน้ำบนสไลด์ นำไปตรวจดูภายใต้กล้อง

การทำ Microtome Section (ดัดแปลงจากภูวดล, 2528)

1. การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (Killing and Fixing) นำชิ้นส่วนของเปลือกมังคุดที่ได้รับแรงกดทับที่ตัดแล้วแยกไปแช่น้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์คือ formalin-acetic alcohol (FAA) 95% โดยใช้

Ethyl alcohol 95%	50 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5 มิลลิลิตร
Formalin	10 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35 มิลลิลิตร

ที่บรรจุในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเปลือกมังคุด

2. การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 95% เข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ ได้อย่างทั่วถึง ที่ 600 mg.Hg นาน 30 นาที จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสุญญากาศ 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ดำเนินการโดย นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) และ ethyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับ 50, 70, 85, 95, และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100 % ให้ผสมสี erythrosine ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อติดสีมองเห็นชัดเจน

ตารางที่ 3 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเซลล์เนื้อเยื่อ

Composition	Approximated total percentage of alcohol				
	50	70	85	95	100
Distiled water (ml)	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol (ml)	40	50	50	45	-
Tertiary butyl alcohol (ml)	10	20	85	55	75
100% ethyl alcohol (ml)	-	-	-	-	25

4. การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) โดยแช่ชิ้นส่วนพืชที่ดึงน้ำออกแล้วใน TBA 100 % 3ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียว นาน 24 ชั่งโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 60 °ซ ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดที่มี paraplast เหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 24 สัปดาห์

5. การฝังเนื้อเยื่อ (embedding) โดยนำเนื้อเยื่อมาฝังใน paraplast เหลว เหมือนวัตถุในแม่พิมพ์ paraplast เหลวก็จะแข็งตัว และทำหน้าที่ยึดห่อหุ้มให้ชิ้นส่วนพืชสามารถรับคมมีดได้เต็มที่ และไม่ให้เนื้อเยื่อบางส่วนหลุดออกไปขณะที่ตัด วิธีการคือ พับกระดาษเป็นรูปแม่พิมพ์ หรือที่เรียกว่า กระทง (boat) นำกระทงมาวางบนโต๊ะที่มีความราบเรียบ ก่อนวางกระทงควรใช้กระดาษรองโต๊ะเสียก่อน จากนั้นวางกระทงลงไป แล้วเท paraplast เหลวลงในกระทง ให้ระดับ paraplast เหลวต่ำกว่าขอบกระทงเล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน ไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นใน paraplast เหลวให้หมดโดยเร็ว พอ paraplast เหลวแข็วตัวสูงขึ้นมาประมาณ 1 ใน 4 ของทั้งหมด หรือประมาณ 2 มิลลิเมตร รีบนำชิ้นส่วนพืชลงใน paraplast เหลว (กระทง) ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟไล่ฟองอากาศออกให้หมดอีกครั้ง และพร้อมกับการจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในระนาบที่สามารถนำไปตัดได้ตามจุดประสงค์ ปล่อยให้ paraplast เหลวแข็งตัวหลังจากนั้นแกะกระดาษออก จะได้รูป paraplast เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สี่เหลี่ยมข้างในเป็นเนื้อเยื่อ ก่อนนำไปตัดต้องนำแท่ง paraplast ที่ embedding ไปตกแต่งโดยให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าให้ตรงกลางเป็นชิ้นส่วนของพืช โดยมี paraplast ล้อมรอบหนาเท่าๆ กันทุกด้าน หลังจากนั้นก็นำแท่ง paraplast ไปติดกับแท่งไม้ที่มีขนาด 1.5x1.5x1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแท่งไม้นี้มีคุณสมบัติในการตัดแต่ง paraplast ด้านหนึ่งและอีกด้านหนึ่งไว้สำหรับยึดกับตัวเครื่องพร้อมที่จะตัด

6. การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่งไม้โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 15 ไมครอน จะได้แถบ paraplast ribbon ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่

7. การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ Haptˆ s adhesive 2% โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร แล้วหยดน้ำยา 1-2 หยด ทาบนกระจกสไลด์ โดยใช้พู่กันเกลี่ยบริเวณที่ตัดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast ที่ตัดไว้ วาง บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้ง วางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์

8. นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนต่อไปนี้ (แต่ละขั้นตอนแช่สไลด์นานประมาณ 3-5 นาที)

8.1 xylene

8.2 xylene + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1

8.3 ether + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1

8.4 ethyl alcohol 95%

8.5 ethyl alcohol 70%

8.6 ethyl alcohol 50%

8.7 ethyl alcohol 30%

8.8 สี hematoxylin นานประมาณ 3 นาที

8.9 ล้างด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง

8.10 ethyl alcohol 30%

8.11 ethyl alcohol 50%

8.12 ethyl alcohol 70%

8.13 ethyl alcohol 95%

8.14 ethyl alcohol 100%

8.15 xylene + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1

8.16 xylene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada balsam หยดบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด นำแผ่น cover slip ปิดทับลงไปไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้จนแห้งสนิทประมาณ 1-2 วัน

10. นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้อง photo microscope

การวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

ตามวิธีการดัดแปลงของ Bruce และ West (1988) อ้างโดย สมศักดิ์ (2538)

1. เตรียม insoluble-alcohol (ลิกนินที่ไม่ละลายในแอลกฮอล์) จากเปลือกมังคุด โดยชั่งตัวอย่างเปลือกมังคุด 3 กรัม เติม absolute methanol 12 มิลลิลิตร บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยาประมาณ 5 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ในขณะที่กรองเติม absolute methanol ลงไปด้วย จากนั้นนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอล์ย จะได้ส่วนที่เป็น insoluble-alcohol

2. นำส่วนที่เป็น insoluble-alcohol ไปทำปฏิกิริยา

2.1 แบ่งส่วนที่ได้จากการอบ ไป 50 มิลลิกรัม แล้วนำไปใส่หลอดที่มีฝาเกลียวปิด

2.2 เติมด้วยกรดไฮโดรครอลิก ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.3 เติมกรดไทโอไกลโคลิกปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.4 ปิดฝาเกลียวให้สนิท นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงแล้วปล่อยไว้ให้เย็น

2.5 ถ่ายสารจากหลอดเกลียวใส่ในหลอดเหวี่ยงแล้วนำไปเหวี่ยงที่ 18,000 xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.6 ค่อยๆ รินส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร 1 ครั้ง

2.7 ตะกอนที่ได้จาก 2.6 นำไปเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล 5 มิลลิเมตร

2.8 นำหลอดสารละลายข้อ 2.7 มาปิดด้วยพาราฟิล์มและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อสกัดลิกนินไทโอไกลโคเลต

2.9 นำไปเหวี่ยง 18,000 xg เป็นเวลา 20 นาที

2.10 เก็บส่วนใสแล้วเติมกรดไฮโดรครอลิก ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร

2.11 นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

2.12 นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนที่ใสไป เก็บส่วนที่เป็นตะกอนสีส้มน้ำตาลไว้ นำไปละลายในโซเดี่ยมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มอล 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณเพกตินทั้งหมด (Rousr *et al.*, 1995)

การเตรียมสารเคมี

1. เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

2. เตรียมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 63 โดยตวง Absolute Ethanol ปริมาณ 63 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

4. เตรียมสารละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย Siliconeantifoaming Agent (สารป้องกันการเกิดฟอง)

6. เตรียมสารละลาย alcohol carbazole ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยชั่ง carbazole ปริมาณ 0.1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมขึ้นมาใหม่ทุกครั้งเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

การแยกตะกอนสารประกอบเพกตินทั้งหมด

1. ชั่งน้ำหนักเปลือกส่วนที่แข็งมา 3 กรัม ปั่นให้ละเอียดคั้นเอาแต่น้ำ ปิเปตตัวอย่างมาครั้งละ 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลาย anti-foaming agent 1-2 หยด

2. เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge คนให้เข้ากันด้วยเครื่องแก้ว จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นใช้แท่งแก้วคนบางครั้ง เมื่อครบเวลานำหลอด centrifuge ขึ้นล้างแท่งแก้วด้วยเอทานอล อีก 10 มิลลิลิตร

3. นำหลอด centrifige มาแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงโดยใช้อัตราความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นค่อยๆ เทส่วนของเหลวทิ้งไป นำตะกอนที่ได้มาสกัดต่อ

4. ทำการสกัดตามขั้นตอนที่ 2 และ 3 โดยเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 63 ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ครั้งละ 40 มิลลิลิตร ทำการสกัดเช่นนี้ 2 ครั้ง ตะกอนที่ได้เป็นตะกอนของสารประกอบเพกติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมี

1. ใช้หลอดทดลองขนาดใหญ่เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ต่อไปนี้

หลอด A สารละลายเพกตินที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร + สารละลาย alcohol-carbazol 0.5 มิลลิลิตร

หลอด B สารละลายเพกตินที่เตรียมได้ 1มิลลิลิตร+ สารละลาย เอทานอล 0.5 มิลลิลิตร

หลอด C น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร + สารละลาย alcohol-carbazole 0.5 มิลลิลิตร

หลอด D น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร + สารละลาย Ethanol 0.5 มิลลิลิตร

2. เตรียมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 6 มิลลิลิตร โดยใช้สูบชักดูดสาร (Dispensette) ค่อยๆ กดปล่อยกรดซัลฟูริก มาตามข้างหลอดช้าๆ แต่ให้หมดภายใน 7 วินาที

3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเหวี่ยงผสม (vortex) จากนั้นนำหลอดทดลองลงไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิน้ำที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำหลอดขึ้นแล้วปล่อยให้เย็นประมาณ 15 นาที

4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพกตินที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบกับ กราฟมาตรฐาน ของ galacturonic acid monohydrate

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. เตรียม stock solution ของสารละลาย galacturonic acid monohydrate โดยชั่ง galacturonic acid monohydrate ปริมาณ มิลลิกรัม 120.5 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลลาร์ ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการขยายตัวของสายโมเลกุล galacturonic acid monohydrate สารละลายที่เตรียมได้นี้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เจือจางสารละลาย galacturonic acid monohydrate ตามข้อ 1 ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 40, 50, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3. เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเพกทิน เช่นเดียวกับในตัวอย่างจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ galacturonic acid monohydrate เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย galacturonic acid monohydrate ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นทำให้ได้สมการเส้นตรงและนำมาใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบ เพกทินที่มีในตัวอย่าง

5. สมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน $y = a(x) + b$

y = ปริมาณสารประกอบเพกติน มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อลิตร

a = ค่าความชันของเส้นกราฟ

x = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานหลังจากหักลบด้วย blank แล้ว หรือเขียนได้ว่า

x = (ค่าการดูดกลืนแสง หลอดทดลอง A –หลอดทดลองB –หลอดทดลอง C –หลอดทดลอง D)

b = ค่าคงที่ของสมการ

วิธีการคำนวณ

คำนวณค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างเช่นเดียวกับของสารละลาย ทำให้ได้ค่า x นำไปแทนในสมการข้างต้นเพื่อคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพกตินที่มีในตัวอย่างวิเคราะห์ ซึ่งจำเป็นต้องนำมาคำนวณให้อยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตรของตัวอย่าง เริ่มต้นดังนี้

$$Y = \frac{X \times 100}{\delta}$$

Y = ปริมาณสารประกอบเพกตินในตัวอย่างวิเคราะห์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

X = ปริมาณสารประกอบเพกตินที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

ð = ปริมาตรของตัวอย่างเท่ากับ 15 มิลลิลิตร

100 = ค่าคงที่ในการปรับหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อ100 กรัม

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาความต้านทานความเสียหายของผลมังคุดเมื่อได้รับแรงกดทับ

วางแผนการทดลองแบบ factorial 3x7 in CRD แบ่งมังคุดออกเป็น 3 กลุ่มตามขนาดน้ำหนัก (60-90 กรัม, 90-120 กรัม และ 120-150 กรัม) มี 7 กรรมวิธีแต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ผล

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ได้รับแรงกดทับ (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ได้รับแรงกดทับ 1 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 ได้รับแรงกดทับ 2 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 ได้รับแรงกดมับ 3 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

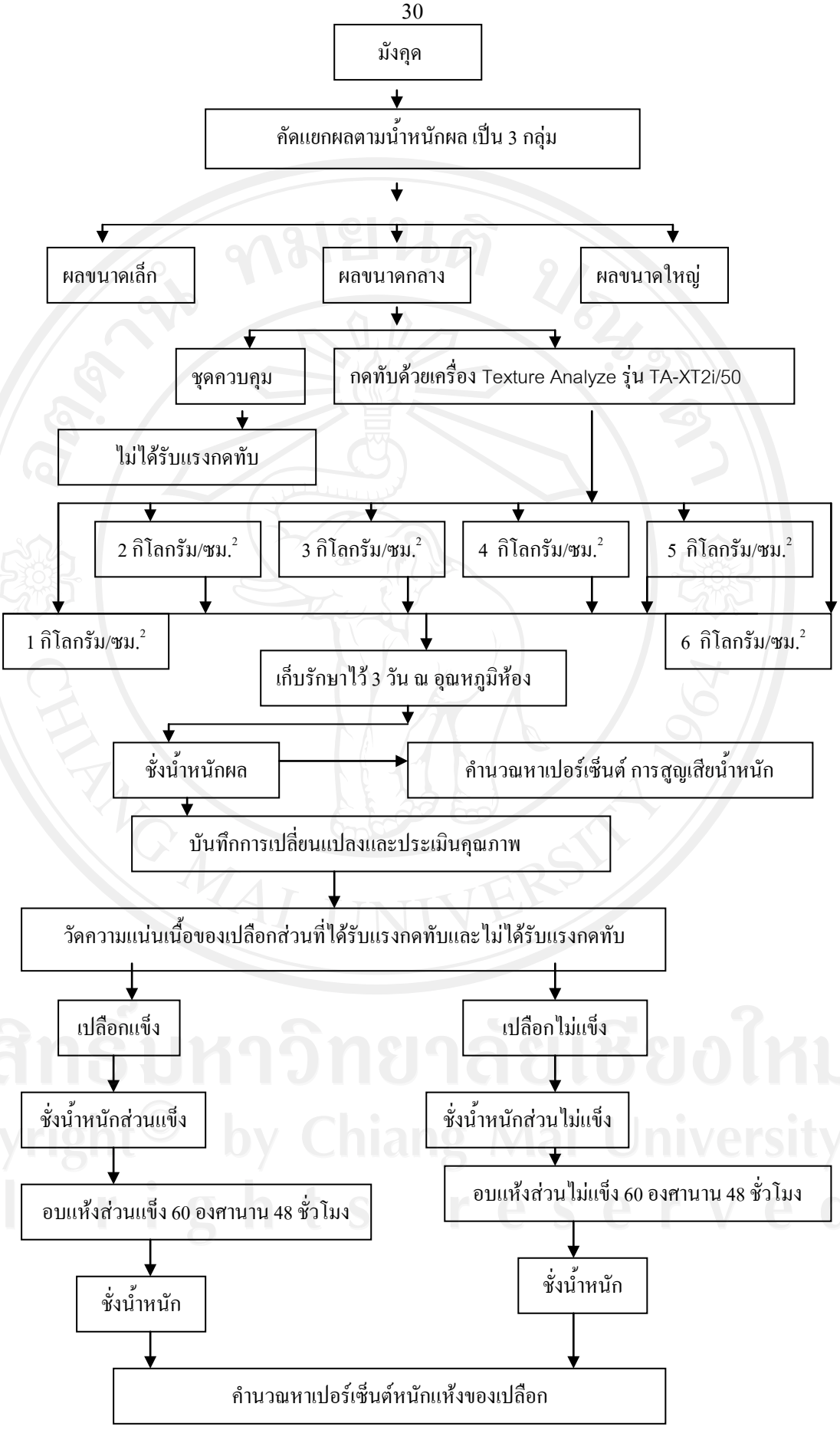
กรรมวิธีที่ 5 ได้รับแรงกดทับ 4 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 ได้รับแรงกดทับ 5 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 7 ได้รับแรงกดทับ 6 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

นำผลมังคุดในระยะที่ 4 (สีม่วงแดง) มาคัดเลือกตามขนาดของน้ำหนักแบ่งออกเป็น 3 ขนาด ตามน้ำหนักโดยเป็นผลขนาดเล็กน้ำหนัก 60-90 กรัมต่อผล ขนาดกลางน้ำหนักของผล 90-120 กรัมต่อผล และ ผลขนาดใหญ่น้ำหนัก 120-150 กรัมต่อผล นำผลมังคุดที่คัดไว้แล้วทั้ง 3 ขนาด มาทำให้ได้รับแรงกดทับที่ 1 ถึง 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตรด้วยเครื่อง Texture Analyzer หัวลูกตุ้มขนาด (p1/S) เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร โดยการสุ่มกดลงบนบริเวณเปลือกผลมังคุด 1 ครั้ง พร้อมทั้งทำเครื่องหมายบริเวณที่ถูกกดทับไว้ เก็บรักษาผลมังคุดที่ได้รับแรงกดทับแล้ว เป็นเวลา 3 วัน ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำผลมังคุดมาชั่งน้ำหนักทั้งผล เจาะเปลือกบริเวณที่ถูกกดทับไปใช้ในการศึกษา ประเมินคุณภาพผลโดย ทางประสาทสัมผัส สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีเนื้อภายในผลให้คะแนน ระดับการช้ำของเนื้อผล โดยเขียนเป็นแผนผังการทดลองดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึกผลการทดลอง

การสูญเสียน้ำหนัก

โดยการชั่งน้ำหนักผลสด ด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง แล้วนำค่ามาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสดจากสูตรดังนี้

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา}} \times 100$$

น้ำหนักแห้งของเปลือกแข็ง

โดยนำเปลือกมังคุดเปลือกแข็งไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศา เป็นเวลา 2 วันจากนั้น นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเปลือกมังคุดที่แข็งตัวจากสูตรดังนี้

$$\text{น้ำหนักแห้งเปลือกแข็ง (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังการอบแห้งของเปลือกมังคุดที่แข็งตัวหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเปลือกแข็งก่อนอบแห้ง}} \times 100$$

น้ำหนักแห้งเปลือกไม่แข็งมังคุด

โดยนำเปลือกมังคุดส่วนที่ไม่แข็งไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศา เป็นเวลา 2 วันจากนั้น นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งแล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเปลือกมังคุดจากสูตรดังนี้

$$\text{น้ำหนักแห้งของเปลือกมังคุด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของเปลือกมังคุดที่ไม่แข็งหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเปลือกไม่แข็งก่อนอบ}} \times 100$$

ความแน่นเนื้อ

คำนวณจากค่าที่อ่านได้จาก เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruits firmness tester) รุ่น FHR-1 ของบริษัท Nippon Optical Works ประเทศญี่ปุ่น แล้วเทียบหน่วยให้เป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยใช้สูตร

$$\text{ความแน่นเนื้อ} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้ (กิโลกรัม)}}{\text{พื้นที่หน้าตัวของหัวทรงกระบอก (ตารางเซนติเมตร)}}$$

พื้นที่หน้าตัดของหัวทรงกระบอก = πr^2

π = 3.143

r = รัศมีทรงกระบอก 0.3 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินคุณภาพจากการให้คะแนน

โดยการเจาะส่วนที่เปลือกแข็งออกมาแล้วแกะเปลือกออกดูสีเนื้อภายในผล การประเมินทางประสาทสัมผัส ประกอบไปด้วยการชิม การดมกลิ่น และดูลักษณะเปลือกภายนอก เป็นแบบ Untrained – panel test ใช้ผู้ชิม 20 คน ที่ไม่ได้รับการฝึกอบรม ในการประเมินคุณภาพ โดยมีระดับคะแนนดังนี้

การยอมรับทางด้านรสชาติ ประเมินโดยวิธีการให้คะแนน 1-3 คือ
คะแนน 1.00 – 1.67 หมายถึง ผู้บริโภคไม่ยอมรับโดยเนื้อผลของมังคุดมีรสชาติไม่ดีไม่เหมาะสมต่อการใช้บริโภค
คะแนน 1.68 – 2.34 หมายถึง ผู้บริโภคไม่แน่ใจโดยเนื้อของผลมังคุดมีรสชาติปกติสามารถใช้บริโภคได้
คะแนน 2.35 – 3.00 หมายถึง ผู้บริโภคยอมรับได้โดยเนื้อผลของมังคุดมีรสชาติดีเหมาะต่อการใช้บริโภค

การประเมินคุณภาพการยอมรับทางสีเนื้อโดยวิธีการให้คะแนน 1-3 คือ
คะแนน 1.00 – 1.67 หมายถึง ผู้บริโภคไม่ยอมรับโดยเนื้อผลมีสีคล้ำมากไม่เหมาะต่อการใช้บริโภค
คะแนน 1.68 – 2.34 หมายถึง ผู้บริโภคไม่แน่ใจโดยเนื้อผลมีสีคล้ำเล็กน้อยยังบริโภคได้
คะแนน 2.35 – 3.00 หมายถึง ผู้บริโภคยอมรับได้โดยเนื้อผลมีสีขาวเหมาะต่อการบริโภค

การประเมินคุณภาพทางด้านลักษณะปรากฏภายนอกโดยวิธีการให้คะแนน 1-3 คือ
คะแนน 1 .00 – 1.67 หมายถึง ผู้บริโภคไม่ยอมรับได้โดยเปลือกผลมีการยุบตัวมากสังเกตด้วยตาเปล่าได้อย่างชัดเจน
คะแนน 1.68 – 2.34 หมายถึง ผู้บริโภคไม่แน่ใจโดยเปลือกผลมีการยุบตัวลงเล็กน้อยสังเกตด้วยตาเปล่าได้
คะแนน 2.35 – 3.00 หมายถึง ผู้บริโภคยอมรับได้โดยเปลือกผลเป็นปกติไม่มีส่วนของเปลือกผลที่ยุบตัวลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของระยะเวลาการเปลี่ยนแปลงของเปลือกมังคุดภายหลังได้รับแรงกดทับ

วางแผน การทดลองแบบ CRD โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเปลือกมังคุด ที่ได้รับแรงกดทับ 4 ระดับคือ 3, 4, 5 และ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร และชุดควบคุมไม่ได้รับแรงกดทับ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 30 นาที เริ่มต้นจากหลังที่ได้รับแรงกดทับทันทีจนถึงนาทีที่ 440 ภายหลังการกดทับ

การทดลอง

นำผลมังคุดระยะที่ 2 (สีม่วงแดง) โดย มังคุดที่ไม่ได้รับแรงกดทับเป็นชุดควบคุม ส่วนได้รับแรงกดทับที่ 3, 4, 5 และ 6 กิโลกรัมโดยการสุ่มกดทับ 1 ครั้ง ที่เปลือกผลพร้อมทำเครื่องหมายไว้เพื่อเห็นได้ชัด สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงทุก 30 นาที ภายหลังการกดทับ เป็นเวลา 450 นาที

การบันทึกผลการทดลอง

สีผล

วัดสีผลมังคุดโดยใช้เครื่องวัดสี (Chromameter) รุ่น CR-300 หัววัด CR-310 ของบริษัท Minoltaประเทศญี่ปุ่น วัดหัวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ซึ่งวัดสีออกมาเป็นค่า L^*, a^*, b^*, chroma และ hue angle โดยทำการวัดบริเวณจุดกึ่งกลางของผล ผลละ 2 จุด

ความแน่นเนื้อ

วัดความแน่นเนื้อโดยใช้ เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruits hardness tester) รุ่น FHR-1 ของบริษัท Nippon Optical Works ประเทศญี่ปุ่น ขนาด 1 กิโลกรัมหัววัดรูปทรง กระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

เนื้อเยื่อทางกายวิภาคของเปลือกมังคุด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะของเนื้อเยื่อเปลือกผลทุก 30 นาที โดยใช้วิธี freehand section

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของเปลือกมังคุดหลังได้รับ แรงกดทับ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ทำการคัดเลือกแรงกดทับที่ทำให้เกิดอาการเปลือกแข็งเพื่อให้ได้ตัวอย่างของเนื้อเยื่อขณะเริ่มเกิดอาการจนแสดงอาการเปลือกแข็ง โดยเลือกแรงกดทับที่ระดับที่ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เพราะทำให้เกิดอาการเปลือกแข็งได้รวดเร็วที่สุด (จากผลการทดลองที่ 2) เปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม (ไม่ได้รับแรงกด) โดย T-test กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ10 ผล

ทำการทดลอง นำผลมังคุดระยะที่ 4 (สีม่วงแดง) โดย มังคุดที่ไม่ได้รับแรงกดทับเป็นชุดควบคุม ส่วนผลได้รับแรงกดทับที่ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยการสุ่มกดทับ 1 ครั้ง บริเวณเปลือกผลพร้อมทำเครื่องหมายไว้ให้สังเกตได้ชัดเจน จากนั้นเริ่มเก็บทุกตัวอย่างมาทำการศึกษาภายหลังจากเปลือกได้รับการกดทับแล้ว 0 ,30 ,60, 90 , 120 , 150 และ 180 นาที

การบันทึกผลการทดลอง

เนื้อเยื่อของเปลือกมังคุด จาก microtome section

ตัดเนื้อเยื่อของเปลือกมังคุดที่ไม่ได้รับแรงกดทับ และที่รับแรงกดทับ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ที่เวลา 0 ,30 ,60, 90 , 120 , 150 และ 180 นาที ภายหลังการกดทับโดยเก็บตัวอย่างบริเวณที่ได้รับแรงกดทับพื้นที่ที่ได้รับความเสียหายเท่านั้นให้ชิ้นส่วนตัวอย่างมีขนาดไม่เกิน 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตรเซนติเมตร เนื่องจากในขั้นตอนการ killing และ fixing จำเป็นต้องให้สารละลายหลายชนิดสามารถแทรกซึมสม่ำเสมอทั่วชิ้นพืช การตัดควรตัดอย่างระมัดระวังและควรใช้มีดที่คมมากเท่านั้น เพื่อไม่ให้เกิดรอยแตก

ปริมาณลิกนิน

เจาะเปลือกมังคุด 3 กรัม เอาผลที่ได้รับแรงกดทับ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 0, 30 , 60, 90 , 120, 150 และ 180 นาที นาทีภายหลังการกดทับและชุดควบคุม เพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินในเปลือก

ปริมาณเพกติน

เจาะเปลือกมังคุด 3 กรัม เอาผลที่ได้รับแรงกดทับ 6 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 0, 30 , 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีภายหลังการกดทับและชุดควบคุม เพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณเพกตินในเปลือก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved