บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ของ Mettler รุ่น P1210
2. เครื่องวัดสี (Hunter 's Colorimeter) ของ Minolta รุ่น CR-200
3. เครื่องมือสำหรับวัดอัตราการหายใจและปริมาณเอธิลีน
   - กล่องพลาสติก tupperware พร้อมฝา ปริมาตร 4.3 ลิตร
   - เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร พร้อมเข็มเบอร์ 25
   - เครื่อง Gas Chromatography ของ Shimadzu รุ่น GC-9A และเครื่องบันทึกผล รุ่น C-R3A
4. เครื่องไตเตรท ของ Merck รุ่น Bürette digital II
5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของ ATAGO รุ่น ATC-1 Brix 0-32 %
6. ชุดเครื่องแก้ว
7. เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermo-couple)
8. กล้องถ่ายรูป
9. ห้องเย็นปรับอุณหภูมิ
10. Evaporator ของ BüCHI

สารเคมี

1. Ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid)
2. Triton X-100
3. Potassium hydroxide
4. สารเคลือบผิว Stafresh 310 (water soluble emulsion wax)
5. Ethyl alcohol 95 %
6. Dichloromethane
7. Sodium hydroxide (NaOH) 0.1 N
8. Phenophthalein 1 %

การเตรียมพืชทดลอง

ผลส้มเขียวหวานจากจังหวัดน่านและภาคกลางที่มีผิวสีเขียวประมาณ 75 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมดหรือมากกว่า และมีความสม่ำเสมอของขนาด โดยเป็นส้มเขียวหวานที่จำหน่ายในตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ. เชียงใหม่

พืชที่นำมาสกัดคาโรตินอยด์

ได้แก่ ผลฟักทองญี่ปุ่น และเปลือกผลส้มฟรีมองต์

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการวิจัย และบันทึกผลการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 และ 2 วางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomized design) และแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design , CRD) สำหรับการทดลองที่ 3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design , CRD)

ปัจจุบันส้มเขียวหวานส่วนใหญ่มีผิวสีเขียว หรือเขียวอมเหลือง ไม่สม่ำเสมอ โดยเฉพาะผลส้มที่ออกสู่ตลาดในฤดูร้อนจะมีผิวสีเขียวเป็นส่วนใหญ่ จึงไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเพราะเข้าใจว่าผลส้มไม่แก่ จึงจำเป็นต้องขจัดสีเขียวออกเพื่อให้ผลส้มมีสีเหลืองโดยใช้สารเอธิฟอนและอุณหภูมิที่เหมาะสม ดังนั้นการศึกษาผลของการใช้สีสกัดธรรมชาติและสารเคลือบผิวต่อคุณภาพของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยวจึงต้องขจัดสีเขียวของผลส้มเสียก่อน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จึงแบ่งออกเป็น 3 การทดลองคือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารเอธิฟอนและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขจัดสีเขียวของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคลือบผิวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว

การทดลองที่ 3 ศึกษาปริมาณของสีสกัดธรรมชาติในกลุ่มรงควัตถุคาโรตินอยด์ที่ใช้ร่วมกับสารเคลือบผิวในการเคลือบผลส้มเขียวหวาน

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร 2-chloroethyl phosphonic acid (เอธิฟอน)และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขจัดสีเขียวของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่ 1 ระดับความเข้มข้นของสารเอธิฟอน มีดังนี้

ความเข้มข้น 0 ppm
ความเข้มข้น 150 ppm
ความเข้มข้น 300 ppm
ความเข้มข้น 600 ppm
ความเข้มข้น 1200 ppm

ปัจจัยที่ 2 ระดับของอุณหภูมิ มีดังนี้

อุณหภูมิ 15 °C
อุณหภูมิ 20 °C
อุณหภูมิ 25 °C

โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในรูปแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) และแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมวิธีการทั้งหมด 15 วิธีการ ในแต่ละวิธีการทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มเขียวหวาน 10 ผล

นำผลส้มเขียวหวานที่มีความสม่ำเสมอของขนาด และสีผิวใกล้เคียงกัน ปราศจากรอยตำหนิและโรค มาล้างด้วยน้ำสะอาดและผึ่งให้แห้งแล้วสุ่มจัดลงในวิธีการต่าง ๆ จากนั้นนำผลส้มไปแช่ในสารละลายเอธิฟอน (ethephon) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งผลให้แห้งอีกครั้ง บรรจุลงถุงพลาสติกที่เจาะรูเพื่อให้อากาศถ่ายเทได้ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การสูญเสียน้ำหนัก และการเปลี่ยนแปลงสีผิว การเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจและอัตราการผลิตเอธิลีน การเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพใน

การบริโภค โดยการชิม เช่น รสชาติ กลิ่น และคุณภาพภายนอก เช่น สีผิว รวมทั้งคุณภาพการบริโภคโดยรวมดังต่อไปนี้

1. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

1.1 การสูญเสียน้ำหนัก วัดการสูญเสียน้ำหนักโดยชั่งน้ำหนักทุก ๆ 2 วัน ตลอดระยะการเก็บรักษา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากสูตร

$$\% \text{ การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังการเก็บรักษา}}{\text{น้ำหนักก่อนการเก็บรักษา}} \times 100$$

1.2 การเปลี่ยนแปลงสีผิว

1.2.1 ประเมินการเปลี่ยนสีผิว โดยให้เป็นระดับคะแนนดังนี้

1 = สีเขียวไม่มีสีเหลือง

2 = สีเขียวอมเหลือง มีสีเหลือง 1-25 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

3 = สีเหลืองอมเขียว มีสีเหลือง 26-50 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

4 = สีเหลืองอมเขียว มีสีเหลือง 51-75 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

5 = สีเหลืองอมส้ม มีสีเหลือง 76-100 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

1.2.2 วัดสีผิวของผลโดยใช้เครื่องวัดสี (Hunter 's colorimeter ของ Minolta model CR-200) บริเวณกึ่งกลางผลทั้ง 2 ด้าน ทำการวัดทุก ๆ 2 วัน ค่าที่ได้แสดงเป็นค่า L , a , b

เมื่อค่า L = The lightness factor (value)

a , b = The chromaticity coordinates (Hue , chroma)

เมื่อค่า L มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L มีค่าสูงเข้าใกล้ 100 วัตถุจะมีสีสว่างสดใส สำหรับค่า a เมื่อมีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีแดง เมื่อมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีเขียว ส่วนค่า b เมื่อมีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน สำหรับสีของผลจะแสดงด้วยค่า Hue ซึ่งหาได้จากสูตร

$$\text{Hue} = \frac{\text{a value}}{\text{b value}}$$

ในกรณีของส้มเขียวหวานค่า Hue ถ้ามีค่าลบมากแสดงว่ามีสีเขียว หากมีค่าเพิ่มขึ้นแสดงว่ามีสีเหลือง

2. การเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจและอัตราการผลิตเอธิลีน

โดยวัดปริมาณก๊าซ CO_2 และก๊าซเอธิลีนที่อยู่ภายในภาชนะบรรจุ ด้วยเครื่อง gas chromatography ของ Shimadzu รุ่น GC-9A และเครื่องบันทึกผล ของ Shimadzu รุ่น C-R3A ในการวิเคราะห์หาปริมาณก๊าซ CO_2 และ C_2H_4 มีส่วนประกอบดังนี้

GC condition for CO_2	GC condition for C_2H_4
Detector : thermal conductivity (TCD)	Detector : flame ionization (FID)
Carrier gas : helium (flow rate = 50 ml/min)	Carrier gas : nitrogen (flow rate = 60 ml/min)
Injection temperature : 80°C	Injection temperature : 90°C
Column temperature : 50°C	Column temperature : 60°C
Column : porapak R	Column : activated alumina
Dectector temperature : 100°C	

การวัดปริมาณก๊าซ CO_2 และก๊าซเอธิลีน ในแต่ละวิธีการใช้ผลส้มเขียวหวานจำนวน 5 ผล โดยนำผลส้มบรรจุลงในกล่องพลาสติก (ปริมาตร 4.3 ลิตร) ในสภาพปิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 25 สุ่มก๊าซตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง gas chromatography เพื่อวัดปริมาณก๊าซ CO_2 และใช้หลอดฉีดยาขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 25 สุ่มก๊าซตัวอย่างปริมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง gas chromatography เพื่อวัดปริมาณก๊าซเอธิลีน เมื่อสุ่มก๊าซตัวอย่างเรียบร้อยแล้วนำผลส้มออกจากกล่องและในไปเก็บรักษาในสภาพเดิม จากนั้นนำปริมาณก๊าซที่ได้ไปคำนวณหาอัตราการหายใจและอัตราการผลิตเอธิลีน ซึ่งได้จากสูตร (Smith,1994)

$$\text{อัตราการหายใจ (ml } CO_2\text{/kg.hr)} = \frac{\text{free volumn (ml)} \times \%\ CO_2 - 0.03}{\text{sample wt (kg)} \times 100 \times \text{sealed time (hr)}}$$

$$\text{อัตราการผลิตเอธิลีน (µl/kg.hr)} = \frac{\text{free volumn (l)} \times \text{ppm ethylene measured}}{\text{sample wt (kg)} \times \text{sealed time (hr)}}$$

3. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

3.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids ,TSS) โดยใช้ hand refractometer ก่อนทำการวัดใช้น้ำกลั่นปรับค่าสเกลให้เป็นศูนย์ก่อน จากนั้นนำน้ำคั้นของผลส้มเขียวหวานมาวัด อ่านค่าที่ได้เป็น °Brix

3.2 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (titratable acidity ,TA) ในรูปของกรดซิตริก โดยนำน้ำคั้นที่เตรียมไว้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask หยดสารละลาย phenophthalein 1 % ลงไป 1-2 หยดเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ นำไปไตเตรทกับสารละลายด่างมาตรฐาน (NaOH 0.1 N) วัดปริมาณสารละลายด่างมาตรฐาน (NaOH) ที่ใช้ไป แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดจากสูตร

$$\%\text{ กรด} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH มาตรฐาน (N)} \times \text{ปริมาตร NaOH (ml)} \times \text{meq. citric acid} \times 100}{\text{ปริมาตรน้ำคั้น (ml)}}$$

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

3.3 อัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ต่อปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (TSS/TA ratio)

4. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพในการบริโภค

เป็นการประเมินคุณภาพภายนอก สีผิว และคุณภาพโดยการชิม รวมทั้งคุณภาพการบริโภคโดยรวม ซึ่งจะใช้ผู้ประเมินอย่างน้อย 5 คน

4.1 การประเมินคุณภาพภายนอก สีผิวของผล ให้เป็นระดับคะแนน 1-5 ดังนี้

1 = สีเขียวไม่มีสีเหลือง

2 = สีเขียวอมเหลือง มีสีเหลือง 1-25 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

3 = สีเหลืองอมเขียว มีสีเหลือง 26-50 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

4 = สีเหลืองอมเขียว มีสีเหลือง 51-75 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

5 = สีเหลืองอมส้ม มีสีเหลือง 76-100 % ของพื้นที่ผิวทั้งหมด

4.2 การประเมินคุณภาพโดยการชิม

4.2.1 รสชาติ ให้เป็นระดับคะแนน 1-7 ดังนี้

1 = เปรี้ยวมาก

2 = เปรี้ยวปานกลาง

3 = เปรี้ยวเล็กน้อย

4 = จืด

5 = หวานเล็กน้อย

6 = หวานปานกลาง

7 = หวานมาก

4.2.2 กลิ่น ให้เป็นระดับคะแนน 1-4 ดังนี้

1 = ปกติ

2 = ผิดปกติเล็กน้อย

3 = ผิดปกติปานกลาง

4 = ผิดปกติมาก

4.3 การประเมินคุณภาพการบริโภคโดยรวม ซึ่งพิจารณาจากข้อ 4.1 และ 4.2 แล้วประเมินการยอมรับโดยให้เป็นคะแนนการยอมรับแบบ Hedonic scales (Scott *et al.*,1982 อ้างโดย นิตยา, 2531) ดังนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด (dislike extremely)

2 = ไม่ชอบมาก (dislike very much)

3 = ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately)

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly)

5 = เฉย ๆ (neither like nor dislike)

6 = ชอบเล็กน้อย (like slightly)

7 = ชอบปานกลาง (like moderately)

8 = ชอบมาก (like very much)

9 = ชอบมากที่สุด (like extremely)

สำหรับการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในการบริโภคจะทำการตรวจสอบทุก ๆ 3 วัน โดยใช้ผลส้มเขียวหวานวิธีการละ 3 ผล

การทดลองที่ 2 ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคลือบผิวต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว

จากผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 1 พบว่าสารเอธิฟอน ความเข้มข้น 600 ppm และอุณหภูมิ 25 °C เป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการขจัดสีเขียวของผลส้มเขียวหวาน โดยทำให้ผลส้มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองภายใน 6 วัน จึงนำชุดทดลองดังกล่าวนี้และชุดทดลองที่ไม่ใช้สารเอธิฟอนมาศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคลือบผิวที่มีผลชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 การขจัดสีเขียว 2 วิธีการคือ

สารเอธิฟอนความเข้มข้น 0 ppm อุณหภูมิ 25 °C

สารเอธิฟอนความเข้มข้น 600 ppm อุณหภูมิ 25 °C

ปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารเคลือบผิว Stafresh 310 คือ

ไม่ใช้สารเคลือบผิว

สารเคลือบผิวความเข้มข้น 25 %

สารเคลือบผิวความเข้มข้น 50 %

สารเคลือบผิวความเข้มข้น 75 %

สารเคลือบผิวความเข้มข้น 100 %

โดยวางแผนการทดลองแบบปัจจัยร่วมในรูปแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in CRD) และแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) รวมวิธีการทั้งหมด 10 วิธีการ ในแต่ละวิธีการทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มเขียวหวาน 10 ผล

วิธีการเคลือบผิวผลส้มเขียวหวาน โดยนำผลส้มจุ่มลงในสารเคลือบผิว Stafresh 310 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ทั่วทั้งผลนาน 1-2 นาที จากนั้นใช้พัดลมเป่าให้แห้ง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 °C ศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยพิจารณาจากการนับจำนวนผลส้มเขียวหวานที่เกิดโรคภายหลังการเคลือบผิวทุก ๆ 2 วันของการเก็บรักษาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เคลือบผิว โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนผลส้มเขียวหวานทั้งหมดที่เกิดโรค}}{\text{จำนวนผลส้มเขียวหวานทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองที่ 3 ศึกษาปริมาณของสีสกัดธรรมชาติในกลุ่มรงควัตถุคาโรตินอยด์ที่ใช้ร่วมกับสารเคลือบผิวในการเคลือบผลส้มเขียวหวาน

จากการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลองที่ 2 พบว่าผลส้มเขียวหวานที่ผ่านการขจัดสีเขียวเป็นเวลา 6 วัน และเคลือบผิวด้วยสารเคลือบผิว Stafresh 310 ความเข้มข้น 75 % เหมาะสมต่อการรักษาคุณภาพของผลส้มเขียวหวานหลังการเก็บเกี่ยว คือสามารถลดการสูญเสียน้ำหนัก อัตราการหายใจ และการเกิดโรคได้ดี ดังนั้นนำชุดทดลองดังกล่าวมาศึกษาร่วมกับสีสกัดธรรมชาติในกลุ่มรงควัตถุคาโรตินอยด์เพื่อเคลือบผิวผลส้มเขียวหวาน โดยสกัดเอารงควัตถุพวกคาโรตินอยด์ซึ่งพบในผลฟักทองญี่ปุ่น และเปลือกผลส้มฟรีมองต์ แล้วนำมาผสมกับสารเคลือบผิวดังกล่าว

การสกัดรงควัตถุคาโรตินอยด์

นำผลฟักทองญี่ปุ่น และเปลือกผลส้มฟรีมองต์ มาหั่นแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นใส่ลงในบีกเกอร์พร้อมกับเติม ethyl alcohol 95 % ในอัตราส่วน 1:2 นำไปแช่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 20 °C สังเกตุจนสารละลายมีสีเหลืองและเปลือกไม่มีสี จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดแช่ทิ้งไว้ 1-2 วันกรองเอาสารละลายที่ได้มาระเหยเอา ethyl alcohol ออกโดยใช้เครื่อง evaporator ภายใต้ความดันต่ำ จากนั้นเติม dichloromethane ปริมาตรเท่ากับสารละลายที่ได้ เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นในกรวยแยก จากนั้นแยกเอาสารละลายในชั้นของ dichloromethane ออก แล้วนำสารละลายส่วนที่เหลือกลับมาเติม dichloromethane อีกครั้งเขย่าให้เข้ากันและแยกเอาสารละลายที่ละลายอยู่ใน dichloromethane ออก แล้วจึงนำไปรวมกับครั้งแรก หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมาระเหยเอา dichloromethane ออกจนเกือบแห้ง ด้วยเครื่อง evaporator อีกครั้งแล้วใช้ dichloromethane ปริมาณเล็กน้อยละลายเอาสารที่สกัดได้ออกมาเก็บไว้ในขวด จากนั้นตั้งทิ้งไว้จน dichloromethane ระเหยออกหมด ซึ่งสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนนี้เรียกว่า crude extract ชั่งน้ำหนัก crude extract ที่ได้แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อนำไปผสมกับสารเคลือบผิวในการเคลือบผลส้มเขียวหวานต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปริมาณสีสกัดต่าง ๆ ดังนี้ ไม่ใช้สีสกัด (ชุดควบคุม) , สีสกัดจากฟักทองญี่ปุ่น 0.25 % , 0.5 % , 1 % และสีสกัดจากเปลือกส้มฟรีมองต์ 0.5 %

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design , CRD) โดยทำการทดลองวิธีการละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ผลส้มเขียวหวาน 10 ผล ซึ่งสามารถจัดได้เป็น 5 วิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 สารเคลือบผิว Stafresh 310 75 %
วิธีการที่ 2 สารเคลือบผิว Stafresh 310 75 % ผสมสีสกัดฟักทองญี่ปุ่น 0.25 %
วิธีการที่ 3 สารเคลือบผิว Stafresh 310 75 % ผสมสีสกัดฟักทองญี่ปุ่น 0.5 %
วิธีการที่ 4 สารเคลือบผิว Stafresh 310 75 % ผสมสีสกัดฟักทองญี่ปุ่น 1 %
วิธีการที่ 5 สารเคลือบผิว Stafresh 310 75 % ผสมสีสกัดเปลือกส้มฟรีมองต์ 0.5 %

นำผลส้มเขียวหวานที่ผ่านการขจัดสีเขียวด้วยสารเอธิฟอนความเข้มข้น 600 ppm และไว้ในสภาพอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 6 วัน จุ่มลงในสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ทั่วทั้งผลนาน 1-2 นาที จากนั้นใช้พัดลมเป่าให้แห้ง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20°C ศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2