บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชสมุนไพรและพืชทดสอบ

1. ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.)
2. มะม่วงน้ำดอกไม้

สารเคมี

1. acetone
2. agar
3. chloroform
4. distilled water
5. ethanol
6. ethyl acetate
7. hexane
8. iodine
9. lactic acid
10. methanol
11. phenolphthalein
12. silica gel 60G
13. sodium hydroxide
14. sodium sulfate anhydrous
15. tween 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อราที่ใช้ทดสอบ

1. *Colletotrichum gloeosporioides*
2. *Cladosporium cladosporioides*

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Potato dextrose broth (PDB)

อุปกรณ์สำหรับทำโครมาโตกราฟฟี

1. แผ่นกระจก (TLC, PTLC plate) ขนาด 5×20 และ 20×20 เซนติเมตร
2. column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 42 เซนติเมตร
3. chromatographic tank และ iodine tank

อุปกรณ์อื่นๆ

1. กระบอกฉีดน้ำ
2. เครื่องบดสมุนไพร
3. ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)
4. ตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator)
5. ตู้ถ่ายเชื้อ (transfer chamber)
6. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
7. เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator)
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
9. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (firmness tester)
10. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometer)
11. เครื่องวัดสี (chromameter, color reader)
12. เครื่องชั่งไฟฟ้า
13. เครื่องปั่นผลไม้
14. กล้องจุลทรรศน์
15. กล้องถ่ายรูป
16. มีด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยวิธี Tissue transplanting method (Dhingra and Sinclair, 1995) นำมะม่วงที่เกิดโรคมาตัดเนื้อเยื่อบริเวณขอบแผล จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้มาฆ่าเชื้อด้วย Clorox เข้มข้น 10% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปวางบนอาหาร PDA เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญออกจากชิ้นเนื้อเยื่อจึงตัดปลายขอบโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ขึ้น เมื่อเชื้อราที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เจริญจนได้เส้นใยที่บริสุทธิ์แล้วจึงเลี้ยงเป็น stock culture สำหรับไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. การสกัดสารจากดีปลี

นำผลดีปลีแห้งมาบดให้ละเอียด แช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เอทานอล 95% ในขวดโหล ทิ้งไว้นาน 2-3 วัน โดยหมั่นคนบ่อยๆ จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง และนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำลายออกจนหมด โดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C กากที่กรองออก นำไปแช่ต่ออีก 2-3 ครั้ง ดำเนินการระเหยตัวทำละลายตามขั้นตอนเดียวกัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอไว้ใช้ต่อไป

3. การแยกกลุ่มสารองค์ประกอบด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

นำสารสกัดหยาบ (crude extract) มาจำแนกสารออกฤทธิ์ โดยวิธี TLC (Thin layer chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) เป็น hexane ผสมกับ ethyl acetate และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆ เพื่อหาอัตราส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและศึกษาการเคลื่อนที่ของสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากดีปลี โดยรมด้วยไอโอดีนและคำนวณหาค่า R_f

การเตรียมแผ่น TLC (Thin Layer Chromatography)

ชั่งซิลิกาเจล 60G 40 กรัม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C นานประมาณ 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำซิลิกาเจลมาเคลือบลงบนแผ่นกระจกด้วยความหนา 0.5 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 °C นาน 2 ชั่วโมง

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากดีปลีมาหยดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบาง ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ หยดสารสกัดหยาบจากดีปลีด้วยหลอดคาปิลารีขนาดเล็กลงตรงกลางแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบางให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปใส่ในแท้งค์ที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ สำหรับตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : methanol เมื่อตัวทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลายเคลื่อนที่ได้ระยะห่างจากจุดหยดสาร 15 เซนติเมตร จึงนำแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบางออกจากแท้งค์แล้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเพื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออก รมด้วยไอโอดีน คำนวณหาค่า R_f

4. การทดสอบสารออกฤทธิ์ควบคุมเชื้อราโดยวิธี TLC-bioassay (Adikaram and Banda, 1998)

4.1 ฤทธิ์ควบคุมเชื้อราของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอล

เตรียมแผ่น TLC เช่นเดียวกับข้อ 3 ตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ โดยนำแผ่น TLC ที่ได้มาพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร บันทึกค่า R_f ของแถบที่ต้านเชื้อรา จากวงขาว (clear zone) ที่เห็น

การเตรียมกล่องบ่มเชื้อ (Moist chamber)

นำกล่องพลาสติกใสขนาด 15x25x12 เซนติเมตร ที่มีฝาปิดมิดชิด ล้างทำความสะอาดแล้วทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นเช็ดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อฆ่าเชื้อ บุก้นกล่องด้วยกระดาษทิชชูและพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ชื้น

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

นำเชื้อรา *C. cladosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นำมาขูดเอาสปอร์ออก เทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในสปอร์เชื้อราแล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อเอาเส้นใยและอาหารที่อาจติดไปด้วยออก นำไปนับสปอร์ให้ได้ 25×10^6 สปอร์ /มิลลิลิตร เติม Tween 20 ในอัตราส่วน 0.04 มิลลิลิตร/100 มิลลิลิตร แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว PDB 25 มิลลิลิตร นำไปนับ จำนวนสปอร์โดยเครื่องนับ Haemacytometer ให้ได้ 1×10^6 สปอร์ /มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยวิธี TLC-bioassay

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากดีปลีที่สกัดด้วยเอทานอล มาหยดลงบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบางซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ โดยหยดสารสกัดหยาบจากดีปลีด้วยหลอดคาปิลารีขนาดเล็กลงตรงกลางแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบางให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปใส่ในแท้งค์ที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ สำหรับตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : methanol เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ระยะห่างจากจุดหยดสาร 15 เซนติเมตร จึงนำแผ่นโครมาโต-กราฟฟีผิวบางออกจากแท้งค์แล้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเพื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออก

เมื่อไล่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ออกหมดแล้วนำสปอร์ของเชื้อรา *C. cladosporioides* ที่เตรียมมาแล้วดังข้างต้น พ่นลงบนแผ่นโครมาโตกราฟฟีผิวบาง แล้วนำไปใส่ในกล่องบ่มเชื้อ (Moist chamber) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การเปรียบเทียบฤทธิ์ควบคุมสารสกัดหยาบดีปลีด้วยตัวทำละลายต่างกัน

วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 4.1 แต่ใช้สารสกัดหยาบจากดีปลีที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันได้แก่สารสกัดดีปลีจากเอทานอล สารสกัดดีปลี จากเฮกเซน สารสกัดดีปลีจากคลอโรฟอร์ม และสารสกัดหยาบดีปลีจากเมทานอล และใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ประกอบด้วย hexane : ethyl acetate : methanol ในอัตราส่วนที่ทำให้สารเกิดการเคลื่อนที่ได้ดีที่สุดจากการทำ TLC

5. การแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี column chromatography

5.1 การแยกสารออกด้วยวิธี column chromatography แบบพิเศษ

เมื่อทราบตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราจากวิธี TLC-bioassay แล้วจึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี Column Chromatography

การทำให้สารสกัดหยาบดีปลีอยู่ในรูปผง

นำสารสกัดหยาบจากดีปลีจำนวน 15 กรัมละลายในเมทานอล แล้วเติมด้วยซิลิกาเจล ผสมให้เข้ากัน นำไประเหยเอาเมทานอลออก จนกระทั่งสารสกัดหยาบรวมตัวกับซิลิกาเจลแล้วแห้งเป็นผง เก็บใส่ขวดสีชา ไว้ที่ 4 °C

การเตรียมคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

ชั่งซิลิกาเจล 60 G 30 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ที่ได้จากการทำ TLC และ TLC-bioassay จากนั้นจึงนำไปเทลงในคอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร ที่ทำการล้างด้วยอะซิโตนและทำการอบให้แห้งแล้ว จากนั้นใช้แท่งแก้วคนเพื่อไล่ฟองอากาศและไม่ให้ซิลิกาเจลแยกชั้นกัน ทิ้งไว้สักครู่เพื่อรอให้ซิลิกาเจลเกิดการจับตัวกัน จากนั้นจึงใส่ผงสารสกัดหยาบลงในคอลัมน์จำนวน 3 กรัม เติมตัวทำละลายที่จะนำพาสารต้านเชื้อราในดีปลีออกมา โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (developing solvent) ที่ได้จากการทำ TLC เป็นตัวชะ (eluting solvent) จากนั้นจึงเก็บสารละลายที่ไหลออกมาทางด้านล่างคอลัมน์ครั้งละ 50 มิลลิลิตร

เมื่อเก็บสารละลายจนหมดจึงนำมาทดสอบด้วยวิธี TLC-bioassay อีกครั้ง เพื่อที่จะหาว่าสารในขวดใดมีค่า R_f เท่ากับสารต้านฤทธิ์เชื้อรา จึงนำมารวมกันและทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) เก็บสารต้านเชื้อราในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารเคมีโดยวิธี Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS)

เครื่องมือ/สภาวะในการวิเคราะห์

1. GC 6890 Agilent Technologies

Inlet : 250 °C split ratio 250 : 1

Oven : 70 °C(1 min) – 8°C/min-->230°C(2 min)–10 °C/min-->250 °C(25 min)

Carrier : Helium 1.0 ml/min

Column : Alltech AT-1MS

30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm film thickness

2. MSD 5973(EI) Hewlett Packard

MS Quardrupole : 150 °C

MS Source : 230 °C

(ทำการวิเคราะห์โดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

6.การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในระดับห้องปฏิบัติการ

6.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเส้นใย

ตรวจสอบการออกฤทธิ์ควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี poison food technique เตรียมสารสกัดที่ได้จากข้อ 5.1 ให้มีความเข้มข้น 0, 250, 500, 1000 และ 2000 ส่วนต่อล้านส่วน ผสมในอาหาร PDA ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณรอบๆ โคโลนี เพื่อให้ได้เส้นใยใหม่ที่กำลังเจริญ จากนั้นใช้เข็มที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ทำการย้ายชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใยเชื้อรา ไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยให้สัมผัสกับอาหาร นำไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญจนเต็มจานอาหารเปรียบเทียบ (control) จึงทำการวัดขนาดของโคโลนี คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง ตามวิธีของธรรมศักดิ์ (2528) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \left(\frac{A - B}{A}\right) \times 100$$

A= ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบ (control)

B = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์

ตรวจสอบการออกฤทธิ์ควบคุมการงอกของสปอร์ โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนมีสปอร์เกิดขึ้น จากนั้นนำ cork borer ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว แล้วเจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณที่มีการสร้างสปอร์ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นวุ้น 1 ถึง 5 ชิ้น ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) แล้วนำสารแขวนลอยสปอร์ 0.1 มิลลิลิตรหยดลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารที่ได้จากข้อ 5.1ให้มีความเข้มข้น 250, 500, 1000 และ 2000 ส่วนต่อล้านส่วน ใช้แท่งแก้วงอที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยสารแขวนลอยสปอร์ ให้สปอร์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตรวจผลดูการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เกิดบนผิวหน้าของอาหาร ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ที่งอกต่อการสุ่มนับสปอร์จำนวน 200 สปอร์ แล้วเปรียบเทียบการงอกของสปอร์ คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง ตามวิธีของธารทิพย์ (2540)

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \left(\frac{A - B}{A}\right) \times 100$$

A= จำนวนสปอร์ที่งอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบ (control)

B = จำนวนสปอร์ที่งอกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดที่ได้

7.การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสกับผลมะม่วง

7.1 การประเมินความรุนแรงของโรค

นำสารสกัดจากดีปลีที่ได้จาก column chromatography มาทดสอบกับผลมะม่วงโดยนำผลมะม่วงที่ล้างสะอาดและผึ่งให้แห้งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ทำการปลูกเชื้อราบนผิวผลมะม่วง 6 ชั่วโมงก่อน และกลุ่มที่ไม่ได้ปลูกเชื้อมาชุบสารละลายของสารที่เตรียมไว้โดยมีกรรมวิธีต่างๆดังนี้

1. กรรมวิธีควบคุม (control)
2. ชุบผลด้วยสารละลายสารสกัดจากดีปลี 250 ppm
3. ชุบผลด้วยสารละลายสารสกัดจากดีปลี 500 ppm
4. ชุบผลด้วยสารละลายสารสกัดจากดีปลี 1,000 ppm
5. ชุบผลด้วยสารละลาย benomyl 500 ppm (อัตราแนะนำ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการพิจารณาจากลักษณะที่ปรากฏของโรคบนผิวผลแล้วทำการให้คะแนนตามเกณฑ์ 0-3 คะแนน (อนุวัฒน์, 2545)

0 คะแนน = สภาพผลสมบูรณ์ยังไม่มีร่องรอยของโรค

1 คะแนน = มีจุดดำเป็นพื้นที่รวมกันน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิว (ไม่มีผลต่อการซื้อขาย)

2 คะแนน = มีจุดดำเป็นพื้นที่รวมกันระหว่าง 5-15 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิว (มีผลต่อการซื้อขาย)

3 คะแนน = มีจุดดำเป็นพื้นที่รวมกันมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิว (ไม่สามารถซื้อขายได้)

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการประเมินความรุนแรงของโรคบนผิวมาแปลเป็นความเสียหายของผลผลิต (crop loss) หรือเปอร์เซ็นต์ดรรชนีการเข้าทำลายของโรคตามสูตรของ สืบศักดิ์ (2540) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดรรชนีการเข้าทำลาย} = \frac{A}{B} \times \frac{100}{C}$$

A = ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ

B = จำนวนของผลผลิตที่สุ่ม

C = ระดับสูงสุดของการเป็นโรค

7.2 การตรวจสอบคุณภาพด้านกายภาพ

1. การวัดค่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสดของผลมะม่วงโดยการชั่งน้ำหนักผลมะม่วงตัวอย่างแต่ละผลก่อนการเก็บรักษา เปรียบเทียบกับน้ำหนักผลที่ชั่งได้ในแต่ละระยะของการเก็บรักษา คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักได้โดยใช้สูตร

$$Z(\%) = (W - P)/W \times 100$$

Z = เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักสดของผลผลิต

W = น้ำหนักเริ่มต้นของผลผลิต

P = น้ำหนักหลังการเก็บรักษาของผลผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวัดความแน่นเนื้อ (flesh firmness) ด้วยเครื่อง Digital Force Gauges modes FGV-0.5A to FGV-100 ของ SHIMPO โดยใช้มีดปอกเปลือกบริเวณแก้มผลทั้งสองด้าน แล้ววัดความแน่นเนื้อโดยกดหัวเจาะให้ตั้งฉากกับเนื้อผลจนทะลุลงไปในเนื้อผลหัวเจาะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3. การวัดการเปลี่ยนแปลงสีผิวเปลือกและเนื้อโดยใช้เครื่อง color reader model CR-10 ของบริษัท Minolta นำผลมะม่วงที่เก็บรักษาไว้ทำการวัดสีผิวเปลือกบริเวณกึ่งกลางของแก้มผลทั้งสองด้าน และใช้มีดปอกเปลือกบริเวณแก้มผลทั้งสองด้านออกแล้ววัดค่าสีเนื้อ ค่าที่วัดได้จะแสดงเป็นค่า L, a* และ b* และนำค่าที่ได้นี้ไปคำนวณหาค่า Chroma และ ค่า Hue (McGuire, 1992)

L เป็นค่าความสว่าง (Lightness) มีค่าอยู่ในช่วง 0-100

a* เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greenness)

- a มีค่าบวก เป็นสีแดง
- a มีค่าลบ เป็นสีเขียว

b*เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน(Yellowness/Blueness)

- b มีค่าบวก เป็นสีเหลือง
- b มีค่าลบเป็นสีน้ำเงิน

การคำนวณหาค่า Chroma

นำข้อมูลที่เก็บจากการวัดสีผิวเปลือกและสีเนื้อมาคำนวณหาค่า Chroma ซึ่งเป็นค่าความเข้มของสี ดังสมการ

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

การคำนวณหาค่า Hue

นำข้อมูลที่ได้จากการวัดสีผิวเปลือกและสีเนื้อมาคำนวณหาค่า Hue ซึ่งเป็นค่ามุมของสี (เฉดสี) ดังสมการ

$$\text{Hue angle } (H^\circ) = \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

เมื่อ Theta คือ ค่าเฉดสีเมื่อ a และ b มีค่าเป็นบวก

ATAN คือค่า Arctangent

ถ้า $a > 0$ และ $b \geq 0$ ดังนั้นค่า Hue =Theta

ถ้า $a < 0$ และ $b \geq 0$ ดังนั้นค่า Hue =Theta+180

ถ้า $a < 0$ และ $b < 0$ ดังนั้นค่า Hue =Theta+180

ถ้า $a > 0$ และ $b < 0$ ดังนั้นค่า Hue =Theta+360

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อได้ค่าของช่วงสีแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบสีของ Minolta (CR-200)

0-45	องศาแสดงสีม่วงถึงแดง	180-225	องศาแสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว
45-90	องศาแสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง	225-270	องศาแสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
90-135	องศาแสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว	270-315	องศาแสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง
135-180	องศาแสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว	315-360	องศาแสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

7.3 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

1. การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid, TSS)

นำของเหลวที่ได้จากการปั่นแล้ว มาทำการวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ของบริษัท ATAGO Co., Ltd. รุ่น PR32 (0-32%) ค่าที่ได้หน่วยจะเป็นเปอร์เซ็นต์หรือองศาบริกซ์ (°Brix)

2. การวัดค่าปริมาณกรดรวม (Total titratable acidity, TA)

นำของเหลวที่ได้จากการปั่นเนื้อมะม่วง 10 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรใช้ฟีนอลฟทาลีน ความเข้มข้น 1% เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากนั้นนำปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปในการไตเตรทมาคำนวณหาปริมาณกรดรวม

$$\text{ปริมาณกรดรวม} = \frac{\text{normality of NaOH x equi.wt.of acid x Vol.NaOH}}{W_{sample}} \times 100$$

3. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การวัดค่าความเป็นกรดด่างจะใช้ของเหลวที่ได้จากการปั่นแล้ว มาทำการวัดด้วยเครื่องวัด pH (pH meter) ของ SUNTEX model SP-7

7.4 การประเมินคุณภาพด้วยประสาทสัมผัส

ประเมินคุณภาพผลมะม่วงด้วยการชิมในวันสุดท้ายที่เก็บรักษา โดยเลือกเอาเนื้อมะม่วงบริเวณส่วนกลางของแก้มผล มาตัดแบ่งในแนวขวางกับความยาวของผลเป็นชิ้นๆ การประเมินทำโดยใช้ผู้ชิมจำนวน 5 คน ประเมินโดยถือเกณฑ์การให้คะแนน สีเนื้อ กลิ่น รสชาติและการยอมรับโดยใช้หลักการให้คะแนนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การประเมินคุณภาพการชิม

สีเนื้อ (ธีราพร, 2536)

1 = สีขาว
2 = สีขาวอมเหลือง
3 = สีเหลืองอ่อน
4 = สีเหลืองเข้ม
5 = สีเหลืองอมส้ม
6 = สีส้ม
7 = สีส้มแดง

กลิ่น (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

1 = กลิ่นผิดปกติ(หมัก)
2 = กลิ่นดิบ
3 = ไม่มีกลิ่นดิบ
4 = กลิ่นสุกเล็กน้อย
5 = กลิ่นสุกมาก

รสชาติ (ณรงค์ศักดิ์, 2537)

0 = รสผิดปกติ
1 = จืด
2 = เปรี้ยว
3 = หวานอมเปรี้ยว
4 = หวานน้อย
5 = หวานปานกลาง
6 = หวานที่สุด

เนื้อสัมผัส (อนุวัฒน์, 2545)

1 = นิ่มเละ
2 = ค่อนข้างนิ่ม
3 = นิ่มปานกลาง
4 = ค่อนข้างแข็ง
5 = แข็ง

การยอมรับ (ธีราพร, 2536)

1 = ไม่ชอบมากที่สุด
2 = ไม่ชอบมาก
3 = ไม่ชอบปานกลาง
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
5 = เฉยๆ
6 = ชอบเล็กน้อย
7 = ชอบปานกลาง
8 = ชอบมาก
9 = ชอบมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved