

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 ที่ใช้ทดลองเป็นเมล็ดพันธุ์จากศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งปลูกในเดือนกรกฎาคม 2546 และเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน 2546 โดยผ่านการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์และลดความชื้นเมล็ดพันธุ์จนเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้เพาะความงอก (seed germinator) รุ่น KPB 6395 FL
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น MIR-553
3. Gas Chromatography (GC) รุ่น Trace GC 2000
4. Headspace oxygen/carbondioxide analyzer รุ่น 6600
5. เครื่องบดตัวอย่าง ยี่ห้อ Foss Tecator รุ่น Cemotec
6. เครื่องวัดค่านำไฟฟ้า (conductivity meter) รุ่น Professional Meter PP-20
7. ตู้อบไอร้อนแบบไฟฟ้า (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UM 500
8. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น PB 3002-S
9. กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic
10. ตะเกียงแอลกอฮอล์
11. ถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝา
12. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
13. กระดาษเพาะเมล็ด
14. กระดาษฟาง
15. กระดาษ Whatman No.1 และ 3
16. เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
17. คีมคีบ (forcep)

วิธีทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ 4×5 Factorial in RCB (Randomize Complete Block Design) โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ 4 เดือน คือ 1, 2, 3 และ 4

ปัจจัยที่ 2 ภาชนะบรรจุสำหรับเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ 4 ชนิด คือ ถุงพลาสติกชนิด MPET (Metallized Polyethylene Terephthalate) ถุงพลาสติกชนิด Nylon (Polyamide) ถุงพลาสติกชนิด PE (Polyethylene) และถุงพลาสติกสาน (Woven Polypropylene) ซึ่งผ่านการทดสอบคุณสมบัติในการซึมผ่านของไอน้ำในบรรยากาศและการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนผ่านแผ่นฟิล์มดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนลักษณะของถุงพลาสติกแต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 1

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำในบรรยากาศผ่านแผ่นฟิล์ม

ตัวอย่างฟิล์ม	ความหนา (μ)	ค่าที่วัดได้	หน่วย
MPET	80	0.0914	cc/m ² /hr
Nylon	110	0.0041	cc/m ² /hr
PE	90	0.2543	cc/m ² /hr

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนผ่านแผ่นฟิล์ม

ตัวอย่างฟิล์ม	ความหนา (μ)	ค่าที่วัดได้	หน่วย
MPET	80	63	g/m ² /hr
Nylon	110	116	g/m ² /hr
PE	90	1364	g/m ² /hr



ภาพที่ 1 ภาพขณะบรรจุชนิดต่างๆ ที่ใช้เก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 ขณะเก็บในห้องเย็นที่ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 จ.เชียงใหม่ เป็นเวลา 4 เดือน

ก = ถุงพลาสติกชนิด Nylon (Polyamide)

ข = ถุงพลาสติกสาน (Woven Polypropylene)

ค = ถุงพลาสติกชนิด MPET (Metallized Polyethylene Terephthalate)

ง = ถุงพลาสติกชนิด PE (Polyethylene)

ทำการบรรจุเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในถุงพลาสติกแต่ละชนิดๆ ละ 5 กิโลกรัม จำนวน 4 ซ้ำ ถุงพลาสติกชนิด MPET ถุงพลาสติกชนิด Nylon และถุงพลาสติกชนิด PE ถูกปิดผนึกถุงด้วยระบบความร้อน ส่วนถุงพลาสติกสานเย็บปากถุงด้วยเครื่องเย็บ จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้โดยวางไว้บนแคร่ไม้ในห้องเย็นของศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม - เมษายน 2547 และระหว่างการเก็บรักษาได้ทำการสุ่มเมล็ดออกมาตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทุกๆ เดือน ดังนี้

1. การทดสอบความชื้นเมล็ด

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยวิธี Air-Oven Method โดยใช้เมล็ดที่บดละเอียดแล้วจำนวนตัวอย่างละ 5 กรัมใส่ในกระป๋อง จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง (ISTA, 1999) เปอร์เซ็นต์ความชื้นเมล็ดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด (Wet weight basis) จากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

โดย M_1 = น้ำหนักเป็นกรัมของกระป๋อง
 M_2 = น้ำหนักเป็นกรัมของกระป๋องและเมล็ดก่อนอบ
 M_3 = น้ำหนักเป็นกรัมของ กระป๋องและเมล็ดหลังอบ

2. การทดสอบความงอกมาตรฐาน

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาทดสอบความงอก โดยนำเมล็ดพันธุ์มาเพาะด้วยวิธีระหว่างกระดาษ (Between Paper Method) จำนวน 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด นำไปไว้ในตู้เพาะความงอกที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประเมินผลความงอกหลังเพาะในวันที่ 5 และ 8 บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก (ISTA, 1999)

3. การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

3.1 ทดสอบค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ด (Conductivity test) โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมา 25 เมล็ด ซั่งหาน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง ทดสอบ 4 ซ้ำ นำเมล็ดพันธุ์แต่ละซ้ำใส่ลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 75 มิลลิลิตร นำไปไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นำเฉพาะสารละลายส่วนบนมาทำการทดสอบค่านำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Professional Meter PP-20 คำนวณค่าที่ได้มีหน่วยเป็น $\mu\text{mhos/g}$ (ISTA, 1999) ค่าการนำไฟฟ้าที่ได้ถ้ามีค่ามากกว่า 150 $\mu\text{mhos/g}$ จะแสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนั้นมีการเสื่อมคุณภาพและไม่สามารถนำไปเป็นเมล็ดพันธุ์หรือนำไปเพาะปลูกได้ (AOSA, 1981)

3.2 ทดสอบโดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated Aging test) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ซ้ทดสอบจำนวน 200 เมล็ดใส่ในตะแกรงแล้วใส่ในขวดเร่งอายุที่มีปิดฝาสนิทนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะโดยวิธีระหว่างกระดาษ จำนวน 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ดและทำการประเมินผลความงอกหลังเพาะในวันที่ 5 และ 8 บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก (ISTA, 1999) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความงอกตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ถือว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูง ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกระหว่าง 55-60 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงปานกลางและเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกตั้งแต่ 54 เปอร์เซ็นต์ลงไปจัดเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำ (AOSA, 1981)

3.3 ทดสอบโดยวัดปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid: FFA) โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดแล้วมาอบไล่ไอน้ำออกให้หมด ซั่งเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้งมาแล้วมา 3-5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไป 30 มิลลิลิตร ปิดจุก

และนำไปเขย่าให้เข้ากันประมาณ 30 นาที กรองของเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่พับเป็นจีบ (pleated) ใส่ลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีก 2-3 ครั้งและล้าง flask ด้วยตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย นำ flask ที่บรรจุสารละลายไขมันปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องให้ตัวทำละลายระเหยออกไป แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนักไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้แล้วนำไปไตเตรตหาปริมาณกรดไขมันอิสระ เตรียมตัวทำละลายโดยใช้เอซิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟธาไลน์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ค่อยๆไตเตรตตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ใช้ค่าประมาณ 2-3 หยด) ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างน้ำมันประมาณ 2-5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท เติมน้ำมันตัวทำละลายผสมที่เป็นกลางลงไปละลายน้ำมันตัวอย่าง ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เขย่าขณะทำการไตเตรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูซึ่งคงตัวนาน 15 วินาที บันทึกปริมาณของค่าที่ใช้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดโอเลอิก 0.0282 กรัม หรือกรดปาล์มิติก 0.0256 กรัม หรือกรดลอริก 0.0200 กรัม โดยปกติน้ำมันจะมีปริมาณกรดอิสระประมาณ 0.5-1.5 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของกรดโอเลอิก ซึ่งสำหรับการทดลองนี้เป็นการหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีในเมล็ดถั่วเหลือง ดังนั้นจึงได้คำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระในรูปของกรดโอเลอิก (oleic acid) (นิชิยา,2541) ดังนี้

$$\% \text{FFA} = (V \times 0.0282) \times 100$$

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ใช้

การคำนวณหาค่าปริมาณกรดไขมันอิสระในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่า ถ้ามีค่ากรดไขมันอิสระสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์แสดงว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเสื่อมคุณภาพค่อนข้างสูง (จวงจันทร, 2529)

4. การตรวจหาปริมาณก๊าซภายในถุงบรรจุภัณฑ์

การตรวจหาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนภายในถุงบรรจุภัณฑ์วัดโดยใช้เครื่อง Head Space และ Gas Chromatography (GC) ทำการวัดโดยใช้เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตรแทงถุงพลาสติกตรงที่ติด septum ไว้เพื่อป้องกันถุงรั่วตอนดึงเข็มออก และดูดก๊าซภายในถุงประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้หัววัดระบบ TCD (thermal conductivity detector) ที่มีกระแสจ่ายเลี้ยงหัววัด 150 มิลลิแอมป์ มีคอลัมน์เป็น Porapak R 80/100 mesh ความยาว 5 เมตร มีฮีเลียมเป็น

ก๊าซพา (carrier gas) ซึ่งมีอัตราเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์หรืออุณหภูมิตู้ (oven temperature) เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของจุดฉีด (injector port) เท่ากับ 80 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของจุดวิเคราะห์ (detector) เท่ากับ 120 องศาเซลเซียส วัดผลทุกเดือนและบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของก๊าซที่วัดได้

5. การตรวจหาปริมาณของเชื้อราของเมล็ดพันธุ์

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ที่อยู่ภายในเมล็ดพันธุ์หรือติดอยู่ภายนอก โดยวิธีเพาะบนกระดาษซับ (Blotter Method) โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.3 1 แผ่นและกระดาษฟาง 3 แผ่น ซ้อนกัน โดยให้กระดาษฟางอยู่ด้านล่าง จุ่มกระดาษทั้งหมดให้ชุ่มในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำมาวางในจานแก้วเพาะเชื้อ ตุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาด้วยอย่างละ 400 เมล็ด นำมาวางบนกระดาษซับ โดยวางเมล็ดจำนวน 10 เมล็ด/จาน ปิดฝาจานเพาะเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน (ISTA, 1999) ตรวจดูเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทุกเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic และบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์เชื้อราที่ตรวจพบในการทดลองทุกๆ เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SX 7 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) สำหรับเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติและเปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการนับมีค่าอยู่ระหว่าง 0-30 เปอร์เซ็นต์ จึงต้องแปลงข้อมูล (transformation) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี square root ($x + 0.05$) (Gomez and Gomez, 1984)

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการสาขาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว สถานีวิจัยการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการโรคเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่