บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 ที่ใช้ทดลองเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากแปลงเกษตรกร อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งปลูกในเดือนธันวาคม 2546 และเก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน 2547 โดยผ่านการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์และลดความชื้นเมล็ดพันธุ์จนเหลือ 9.06 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. เครื่องวัดค่า Water activity รุ่น Testo 650
8. ตู้อบไอร้อนแบบไฟฟ้า (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UM 500
9. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น PB 3002-S
10. เครื่อง Digital Titrate
11. กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์
13. ถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝา
14. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
15. กระดาษเพาะเมล็ด
16. กระดาษฟาง
17. กระดาษ Whatman No.1 และ 3
18. เข็มฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
19. คีมคีบ (forcep)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ Factorial in RCB (Randomize Complete Block Design) โดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 4 เดือน คือ 1, 2, 3 และ 4 และปัจจัยที่ 2 คือ ภาชนะบรรจุ 4 ชนิด ได้แก่ ถุงพลาสติกชนิด Metallized film (ชนิด Metallized Polyethylene Terephthalate; MPET) ถุงพลาสติกชนิด Aluminum foil ถุงพลาสติกชนิด Polypropylene (PP) และถุงพลาสติกสาน (woven sacks) โดยบรรจุเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองถุงละ 5 กิโลกรัม อย่างละ 4 ซ้ำ ถุงพลาสติกชนิด Metallized film ถุงพลาสติกชนิด Aluminum foil และถุงพลาสติกชนิด PP ถูกปิดผนึกถุงด้วยระบบความร้อน ส่วนถุงพลาสติกสานเย็บปากถุงด้วยเครื่องเย็บ จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้โดยวางไว้บนแคร่ไม้ในห้องเย็นของศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 เชียงใหม่ เก็บรักษาภายใต้สภาพอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม - กันยายน 2547 ทำการสุ่มเมล็ดออกมาตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ก่อนเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษาทุกๆเดือน ได้ทำการสุ่มเมล็ดออกมาตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ดังนี้ ความชื้นเมล็ด ค่า A_w ความงอก ความงอกหลังผ่านการเร่งอายุ ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณกรดไขมันอิสระ อัตราการหายใจ (ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน) ปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด และปริมาณเชื้อราในโรงเก็บที่สำคัญ

ตารางที่ 2 ค่าการซึมผ่านของไอน้ำในบรรยากาศและก๊าซออกซิเจนผ่านแผ่นฟิล์ม (Thai Plastic Industries Association, 2004)

ชนิดของแผ่นฟิล์ม	ความหนา (μ)	ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ ($cc/m^2/hr$)	ค่าการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน ($g/m^2/hr$)
Aluminum foil	70	0.0895	65
Metallized film(MET)	80	0.0914	63
Polypropylene(PP)	110	0.2472	1378

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การทดสอบค่า Water activity (A_w)

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 25 เมล็ดต่อซ้ำ(ทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ) บรรจุลงในถ้วยพลาสติก บรรจุถ้วยพลาสติกลงในเครื่องวัดค่า A_w ระบบดิจิตอล รุ่นTesto 650 ปิดฝาครอบนาน 30 นาที บันทึกผลเป็นค่าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2. การทดสอบความชื้นของเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยวิธี Hot –Air Oven Method โดยใช้เมล็ดที่บดละเอียดแล้ว ตัวอย่างละ 5 กรัมใส่ในกระป๋อง จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง (ISTA, 1985) เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักสด (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 = น้ำหนักเป็นกรัมของกระป๋องและเมล็ดหลังงอก

3. การทดสอบความงอกมาตรฐาน

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาทดสอบความงอกโดยนำเมล็ดพันธุ์มาเพาะด้วยวิธีระหว่างกระดาษ(Between Paper Method) จำนวน 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ด นำไปไว้ในตู้เพาะ (Germinator) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประเมินผลความงอกหลังเพาะในวันที่ 5 และ 8 บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก (ISTA, 1985)

4. การทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

4.1 ทดสอบค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ (Conductivity test)

ทดสอบค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ (Conductivity test) โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมา 25 เมล็ด ชั่งหาน้ำหนักด้วยเครื่องทศนิยม 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 μmohs/cm/g (ISTA, 1999) ค่าการนำไฟฟ้าที่ได้มีค่ามากกว่า 150 μmohs/cm/g จะแสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนั้นมีค่าการเสื่อมคุณภาพและไม่สามารถนำไปเป็นเมล็ดพันธุ์หรือนำไปเพาะปลูกได้(AOAC, 1981)

4.2 วิธีการเร่งอายุ (Accelerated aging test; AA test)

ทดสอบโดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated Aging test) นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ทดสอบจำนวน 200 เมล็ดใส่ในตะแกรงมีขานำใส่ในขวดเร่งอายุเก็บที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะโดยวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่างกระดาษ จำนวน 4 ซ้ำๆละ 50 เมล็ดและทำการประเมินผลความงอกหลังเพาะในวันที่ 5 และ 8 บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก(ISTA, 1999) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความงอกตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ถือว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูง ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกระหว่าง 55-60 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงปานกลางและเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความงอกตั้งแต่ 54 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจัดเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำ (AOSA, 1981)

4.3 การวัดปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid: FFA)

ทดสอบโดยวัดปริมาณการเกิดกรดไขมันอิสระ(Free Fatty Acid: FFA) นำเมล็ดถั่วเหลืองที่บดละเอียดแล้วมาอบไล่น้ำออกให้หมด ชั่งเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการอบแห้งมาแล้วมา 3-5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเธอร์ลงไป 30 มิลลิลิตร ปิดจุกและนำไปเขย่าให้เข้ากันประมาณ 30 นาที กรองของเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 3 ที่พับเป็นจีบ (pleated) ใส่ลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีก 2-3 ครั้งและล้าง flask ด้วยตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย นำ flask ที่บรรจุสารละลายไขมันปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ตัวทำละลายระเหยออกไป แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ปล่อยให้เย็นใน desiccators ชั่งหาน้ำหนักไขมันหรือน้ำมันที่สกัดได้แล้วนำไปไตเตรตหาปริมาณกรดไขมันอิสระ เตรียมตัวทำละลายโดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ค่อยๆไตเตรตตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (ใช้ด่างประมาณ 2-3 หยด) ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างน้ำมันประมาณ 2-5 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตรที่แห้งสนิท เทตัวทำละลายผสมที่เป็นกลางลงไปละลายน้ำมันตัวอย่าง ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ เขย่าขณะทำการไตเตรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูซึ่งคงตัวนาน 15 วินาที บันทึกปริมาตรของด่างที่ใช้ (การไตเตรตไม่ควรใช้สารละลายด่างเกิน 10 มิลลิลิตร ถ้ามากกว่านี้ต้องทำการทดลองใหม่โดยใช้น้ำมันตัวอย่างให้น้อยลง)

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดโอเลอิค 0.0282 กรัม หรือกรดปาล์มิติค 0.0256 กรัม หรือกรดลอริค 0.0200 กรัม โดยปกติน้ำมันจะมีปริมาณกรดอิสระประมาณ 0.5-1.5 เปอร์เซ็นต์ ในรูปของกรดโอเลอิค ซึ่งสำหรับการทดลองนี้เป็นการหาปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีในเมล็ดถั่วเหลือง ดังนั้นจึงได้คำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระในรูปของกรดโอเลอิค (oleic acid) (นิธิยา, 2541) ดังนี้

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

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ที่ใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาค่าปริมาณกรดไขมันอิสระเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่า ถ้ามีค่ากรดไขมันอิสระสูงถึง 2 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเสื่อมคุณภาพค่อนข้างสูง(จวงจันทร์, 2529)

5. การตรวจหาปริมาณก๊าซภายในถุงบรรจุภัณฑ์

การตรวจหาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนภายในถุงบรรจุภัณฑ์ ทำการวัดโดยใช้เครื่อง Head Space และ Gas Chromatography (GC) ทำการวัดโดยใช้เข็ม (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตรแทงถุงพลาสติกตรงจุดที่ติด septum ไว้เพื่อป้องกันถุงรั่วขณะที่ดึงเข็มออก และดูดก๊าซภายในถุงประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยใช้หัววัดระบบ TCD (thermal conductivity detector) ที่มีกระแสจ่ายเลี้ยงหัววัด 150 มิลลิแอมป์ มีคอลัมน์เป็น Porapak R 80/100 mesh ความยาว 5 เมตร มีฮีเลียมเป็นก๊าซพา(carrier gas) ซึ่งมีอัตราเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์หรืออุณหภูมิตู้(oven temperature) เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของจุดฉีด(injector port) เท่ากับ 80 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของจุดวิเคราะห์(detector) เท่ากับ120 องศาเซลเซียส ทำการวัดผลทุกๆเดือนเป็นเวลา 4 เดือน

6. การตรวจหาปริมาณของเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ที่อยู่ภายในเมล็ดพันธุ์หรือติดอยู่ภายนอกโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) ทำโดยสุ่มเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาตัวอย่างละ 400 เมล็ด ใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 จำนวน 1 แผ่นและกระดาษฟางจำนวน 3 แผ่น ซ้อนกันโดยให้กระดาษฟางอยู่ด้านล่าง จุ่มกระดาษทั้งชุดดังกล่าวลงในน้ำกลั่น ถือกระดาษด้วยปากคีบ รอให้น้ำซึมกระดาษจนทั่ว แล้วยกขึ้นนำมาวางในจานแก้วเพาะเชื้อ โดยวางเมล็ดจำนวน 10 เมล็ด/จาน จำนวน 40 จาน/เมล็ด 1 ตัวอย่างที่เก็บในถุงบรรจุภัณฑ์ ปิดฝาจานเพาะเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูเชื้อราบนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทุกเมล็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic และบันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์เชื้อราที่ตรวจพบในการทดลองทุกๆ เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS 6.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยวิธี least significant difference (LSD) สำหรับเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ตรวจพบบนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำมาทำการทดลอง นำไปแปลงข้อมูล (Transformation) ก่อนวิเคราะห์ด้วยวิธี square root(x+0.05) (Gomez and Gomez, 1984)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved