บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 พันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวไร่ที่ใช้มีทั้งหมด 35 พันธุ์ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองของมูลนิธิโครงการหลวง จากแหล่งพันธุกรรมสถานีเกษตรหลวงปางดะ ตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ใช้ข้าวพันธุ์ กข 6, ขาวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวไร่พันธุ์ อาร์ 258 เป็นพันธุ์ตรวจสอบ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ชื่อพันธุ์ ข้าวไร่ ทั้ง 35 พันธุ์

ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์	ลำดับ	ชื่อพันธุ์
1	ลาซอแดง	**14**	จานอนี	**27**	หลวงพระบาง 7
2	เบนดู	**15**	จากุดิ	**28**	หลวงพระบาง 8
3	ข้าวดำเพชรบุรี	**16**	ข้าวปางอุ๋ง	**29**	หลวงพระบาง 9
4	ข้าวม่ำห่า	**17**	บือหมือ	**30**	หลวงพระบาง 10
5	อะร้อย	**18**	เร้าซื่อหย่ำ	**31**	หลวงพระบาง 11
6	บือกิ	**19**	บือซอมี	**32**	หลวงพระบาง 12
7	นิกอ	**20**	ข้าวขาวแม่ลาน้อย	**33**	หลวงพระบาง 13
8	ข้าวขาวแกน้อย	**21**	SP-821166-PM-6-3-2	**34**	หลวงพระบาง 14
9	ย่าเผอะแซ่	**22**	หลวงพระบาง 1	**35**	หลวงพระบาง 15
10	มะโดะ	**23**	หลวงพระบาง 2		
11	จานอนะ	**24**	หลวงพระบาง 4		
12	ข้าวดำแม่สะเรียง	**25**	หลวงพระบาง 5		
13	ข้าวห้วยน้ำริน	**26**	หลวงพระบาง 6		

หมายเหตุ : - พันธุ์ข้าวทุกพันธุ์มาจากสถานีเกษตรหลวงปางดะ

- พันธุ์ จะนอนะ และหลวงพระบาง 1-15 เป็นข้าวเหนียว พันธุ์นอกนั้นเป็นข้าวเจ้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 การบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization)

ปลูกขยายพันธุ์ทั้ง 35 พันธุ์ บนแปลงขนาด 1 x 8 เมตร ระยะปลูก 25 x 25 เซนติเมตร หยอดเมล็ด 6-8 เมล็ดต่อหลุม การดูแลรักษา และป้องกันกำจัดวัชพืช โรคและแมลง ตามความเหมาะสม โดยทำการทดลองที่ แปลงทดลองและวิจัยไร่แม่เหียะ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในช่วงระหว่างเดือน มิถุนายนถึงเดือนตุลาคม 2553 แล้วบันทึกข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ประเมินลักษณะต่างๆ ตามวิธีของ IRRI-IBPGR (1980)

การบันทึกข้อมูล

1.) บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Characterization)

1.1 ข้อมูลลักษณะของเมล็ดข้าว เช่น น้ำหนัก 1000 เมล็ด ความกว้าง ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือกและรูปร่างของเมล็ดข้าวเปลือก

1.2 ข้อมูลทางคุณภาพสี (Quanlitative) ได้แก่ สีกาบใบ สีลิ้นใบ สีหูใบ สีข้อต่อ สีข้อต่อใบ สีของปล้อง สีกลีบรองดอก สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด และสีของหางข้าว

1.3 ข้อมูลทางปริมาณ (Quatitative) ได้แก่ ทรงกอ ความสูงที่ระยะการเก็บเกี่ยว ความกว้างและความยาวของแผ่นใบ (เซนติเมตร) จำนวนเมล็ดต่อรวง เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี จำนวนระแง้ และผลผลิต

1.4 ข้อมูลของคัพภะ (embryo) วัดความยาวของคัพภะ

2.) บันทึกข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารกาบาและโปรตีนโดยเทียบกับสารกาบามาตรฐานและคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยรวม

การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารกาบา (GABA) แต่ละชั่วโมงการบ่ม

กำหนดระยะเวลาการบ่ม 3 ระยะ คือ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร GABA ตามวิธีของ Kitaoka and Nakano, (1969)

อุปกรณ์

1. เครื่อง UV Spectrophotometer
2. เครื่องบดละเอียด (hammer mill)
3. เครื่องเขย่า (shaker)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ขวดแก้ว (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ไมโครปิเปต
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที (Centrifuge)
7. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
8. กระดาษกรองเบอร์ 1
9. หลอดทดลอง (ขนาด 80 x 120 mm.)
10. กระบอกตวง
11. อ่างน้ำควบคุมความเย็น(Cooling bath)
12. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

สารเคมี

1. Ethanol (C_2H_5OH) 60%
2. Boric acid (H_3BO_3) 0.2M
3. NaOCl 7.5%
4. Phenol (C_6H_5OH) 6%
5. Sodium borate ($B_4Na_2O_7$) 0.2M

การเตรียมสารละลาย

1. Boracte Buffer (pH9) เตรียมจาก 0.2M ของ boric acid (H_3BO_3) 50 ml. กับ 0.2 M ของ Sodium borate ($B_4Na_2O_7$) 59 ml

2. Sodium Hypochlorite Reagent NaOCl 10% ใช้เป็น Stock Solution ส่วน NaCl 7.5% ใช้เป็น Standrad

3. Phenol Reagent เตรียมจาก Phenol (C6H5OH) 6 กรัม ในน้ำ 90 ml. ปรับปริมาตรจนได้สารละลาย Phenol 100 ml.

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.นำสารละลายมาตรฐาน 0.1-0.3 ml.ใส่ในหลอดทดลองขนาด (18*120 mm.) เติม borate buffer 0.2 ml. / Phenol ความเข้มข้น 1.0 ml. เขย่าให้เข้ากัน

2.เติมสารละลาย NaOCl ความเข้มข้น 7.5 % ปริมาณ 0.4 ml. เขย่าให้เข้ากันในอ่างควบคุมความเย็นแล้วไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.นำสารละลายมาตรฐานประมาณ 1.7 – 1.9 ml. เติม 60 % ethanol 1.0 ml. และใช้ 60% ethanol ปริมาณ 2.0 ml. เป็นสารละลายเริ่มต้น

4.นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงเคลื่อน 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

การเตรียมตัวอย่างข้าว

1.นำข้าวเปลือกไปกะเทาะเปลือกให้เป็นข้าวกล้องแล้วนำข้าวกล้องไปแช่ในน้ำที่ขจัดไอออน นาน 6 ชั่วโมง

2.นำข้าวกล้องมาบ่มหรือเพาะให้งอกในเวลาที่แตกต่างกันคือ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง

3.นำข้าวกล้องที่ผ่านการเพาะงอกมาอบเพื่อที่จะลดความชื้นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

4.นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งมาบดด้วยเครื่องบดละเอียด เพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารกาบา

การสกัดสารอาหารกาบา (GABA)

1. ชั่งตัวอย่างแป้งที่บดแล้ว 3 กรัม ใส่หลอดเขย่า ละลายใน 80% ethanol เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง เขย่า (Shaker) นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
2. นำสารที่กรองได้จากข้อ 1 ใส่หลอดแก้วไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสให้เอทธานอลระเหยให้เหลือปริมาณ 0.8 มิลลิลิตรแล้วใช้ไมโครปิเปต ดูดสารสกัดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 1.0 ml. เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
3. นำไปเหวี่ยง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที
4. ใช้ปิเปตดูดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้วแล้ว เติม 0.2m borate buffer 0.2 ml และ 6% Phenol 1.0 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยทำให้เย็นในอ่างควบคุมความเย็น
5. เติม 10% NaOCL 0.4 ml เขย่าประมาณ 1 นาที ในอ่างควบคุมความเย็น แล้วทำให้เย็น
6. นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่คลื่นแสง 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ 60% ethanol 2.0 ml เป็น สารละลายเริ่มต้น (blank)
8. นำค่า absorbance ไปหาปริมาณสารอาหารกาบา โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

<u>การทดลองที่ 3</u> การวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนในเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.0001 กรัม
2. เครื่องย่อยไนโตรเจน
3. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Nitrogen distillation apparatus)
4. เครื่องบดตัวอย่าง (Cyclotec) ความละเอียด 80- 100 เมช (mesh)
5. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่จำเป็น ได้แก่ บีคเกอร์ ขวดวัดปริมาตร ปิเปต หลอดย่อยตัวอย่าง และ Magnetic bar เป็นต้น

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulphuric acid)98% AR grade
2. กรดบอริก (Boric acid) AR grade
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40% (Sodium hydroxide) AR grade
4. เซเรเนียม (Selenium) AR grade
5. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มัล
6. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate) AR grade

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 0.25 กรัม ใส่หลอดย่อยขนาด 250 ml.
2. ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Kjelblet) จำนวน 1 เม็ด และแกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 ml.
3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง 2020 Digestion System นาน 3 ชั่วโมง
4. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้าเครื่องกลั่น Kjelbet System 1026 Distilling Unit ใช้ กรดบอริก 2 % ปริมาณ 25 ml และหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงใน flask ขนาด 250 ml.
6. กลั่นด้วยระบบ Auto ใช้เวลา 5 นาที
7 นำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่น มาไตรเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล
8. คำนวณหาปริมาณโปรตีนหยาบ

$$\% \text{ ไนโตรเจน (Total nitrogen)} = \frac{(A-B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

% โปรตีน (Crude protein) = % N x 6.25

A = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 1.0 นอร์มอลที่ใช้ไตรเตรตกับตัวอย่าง

B = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก 1.0 นอร์มอลที่ใช้ไตรเตรตกับ blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง

0.014 = น้ำหนักกรัมสมบูรณ์ของไนโตรเจน

100 = dilution factor

% โปรตีน = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%) x 6.25

6.25 = Protein conversion factor

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยนำค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของแต่ละลักษณะที่ศึกษาระหว่างพันธุ์ข้าวไร่พันธุ์ต่าง ๆ โดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ใช้โปรแกรมสถิติ SX 8 และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (Correlation analysis) ระหว่างความยาวคัพภะกับโปรตีน และความยาวคัพภะกับปริมาณสารกาบา (GABA) ของข้าวไร่พันธุ์ต่างๆ ใช้วิธีของ Steel and Torres (1960)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved