บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

เมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์หอมมะลิ 105 จากเกษตรกรอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ หลังจากเก็บเกี่ยวในฤดูกาลเพาะปลูก 2545-2546 เก็บเกี่ยวเดือนมีนาคม 2546

อุปกรณ์

1. ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ติดตั้งเทอร์โมสแตท และขดลวดที่ให้ความร้อนไว้ภายในซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ประมาณ 25- 45 องศาเซลเซียส ขนาดความกว้าง 1 เมตร ยาว 1.5 เมตร และสูง 1.5 เมตร จำนวน 2 ตู้
2. ถังพลาสติกทรงกลมมีฝาปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร สูง 1 ฟุต
3. ฝาชีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 เซนติเมตร
4. ถุงตาข่ายพลาสติกสำหรับบรรจุข้าวประมาณ 0.5 กิโลกรัม
5. แก้วน้ำพลาสติก
6. เชือกฟาง
7. เทปกาว
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. ตู้ถ่ายเชื้อ (transfer chamber)
10. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
11. ตู้ดูดควัน (vacuum chamber)
12. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
13. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
14. เข็มเขี่ยเชื้อ
15. loop ถ่ายเชื้อ
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์
17. สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18. กล้อง compound microscope
19. กล้อง stereo microscope
20. flask ขนาด 125 มิลลิลิตร
21. กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร
22. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 500 มิลลิลิตร
23. บิวเรตไดเตรท
24. เครื่องชั่งทศนิยมสองตำแหน่ง
25. เครื่องบดเมล็ด
26. moisture can
27. descicator
28. hot air oven

สารเคมี

1. สารละลายอิ่มตัวที่ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 4 ชนิด คือ
   - สารละลายอิ่มตัวโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์
   - สารละลายอิ่มตัว โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์
   - สารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์
   - สารละลายอิ่มตัวโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์
2. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)
3. ไดเอทธิลอีเทอร์ (diethyl ether)
4. แอลกอฮอล์ 75 และ 95 เปอร์เซ็นต์
5. ฟีนอฟธาลีน (phenophthalene)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

malt salt agar (MSA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

เบื้องต้นนำข้าวเปลือกมาสุ่มตรวจหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด และความชื้นเมล็ด แล้วนำส่วนที่เหลือมาบรรจุใส่ถุงตาข่ายพลาสติกถุงละ 0.5 กิโลกรัม จำนวน 3 ถุง จากนั้นมัดปากถุงด้วยเชือกฟาง นำไปใส่ในถังพลาสติกที่รองรับด้วยฝาชีและแก้ว

พลาสติกโดยมีสารละลายอิ่มตัวที่ให้ความชื้นสัมพัทธ์ 65, 75, 80 และ 85 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอยู่ในถังพลาสติก ปิดฝาให้แน่นพันรอบด้วยเทปกาวอีกชั้น เสร็จแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และอุณหภูมิห้อง ซึ่งจะได้ดังกรรมวิธีต่อไปนี้ คือ

กรรมวิธีที่ 1. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65 % อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 2. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 6. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 7. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 8. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 9. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 10. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 11. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 12. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 13. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% อุณหภูมิห้อง
กรรมวิธีที่ 14. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 15. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 16. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85% อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

นำเมล็ดข้าวเปลือกออกมาสุ่มตรวจหาปริมาณกรดไขมันอิสระ ปริมาณเชื้อรา และความชื้นเมล็ด โดยสุ่มตรวจ 20 วัน/ครั้ง จำนวน 6 ครั้ง จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธีทางสถิติต่อไป

ตอนที่ 1 การหาความชื้นเมล็ดข้าวเปลือก

นำเมล็ดข้าวเปลือกที่สุ่มจากกรรมวิธีต่างๆ มาบดให้ละเอียดแล้วชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงใน moisture can โดยทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆละ 1 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปอบใน hot air oven เพื่อหาความชื้น โดยใช้อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Christensen, 1982) นำออกมาชั่งหาน้ำหนักที่หายไปแล้วคำนวณหาความชื้นเมล็ด บันทึกผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2 การตรวจหาปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวเปลือกโดยวิธีเพาะบนอาหารวุ้น (Agar Plate Method)

นำเมล็ดข้าวเปลือกที่สุ่มจากกรรมวิธีต่างๆมาฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก โดยแช่เมล็ดข้าวลงในสารละลาย Sodium Hypochlorite เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) นำเมล็ดที่ได้ไปวางลงบนอาหารวุ้น 7.5-10 เปอรเซ็นต์ Malt Salt Agar (MSA)ในจานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish) จานละ 20 เมล็ด โดยใช้คีมคีบกดให้บางส่วนของเมล็ดจมลงในอาหาร ทำ 3 ถุงๆ ละ 100 เมล็ด นำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 7 วัน จึงตรวจหาปริมาณและจำแนกชนิดเชื้อราโดยดูลักษณะสืบของโคโลนีที่เจริญบนอาหารและการเปลี่ยนสีใต้อาหารตรวจดูและวัดขนาดโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อรา เช่น conidial head, vesicle, conidia, conidiophore, sterigma, foot cell, cleistothecium, sclerotium และอื่น ๆ ที่เจริญอยู่บนและรอบๆ เมล็ดภายใต้กล้อง stereo microscope และ compound microscope โดยเปรียบเทียบกับหนังสืออ้างอิง The Genus Aspergillus (Raper และ Funell, 1965) บันทึกผลการทดลองโดยบันทึกปริมาณและชนิดของเชื้อราที่จำแนกได้

ตอนที่ 3 การสกัดไขมันโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและการหาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธีไตเตรท

นำเมล็ดข้าวเปลือกมาอบไล่น้ำออกให้หมด บดเมล็ดข้าวเปลือกให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ด ชั่งเมล็ดข้าวเปลือกที่บดแล้วมา 3 กรัม ใส่ในฟลาส์คขนาด 125 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไป 30 มิลลิลิตร ปิดด้วยแผ่นฟอยล์ เขย่าให้เข้ากันประมาณ 30 นาทีกรองของเหลวผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่พับเป็นจีบ (pleated) ใส่ลงใน ฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีก 2-3 ครั้ง และล้างฟลาส์คด้วยตัวทำละลายเพียงเล็กน้อย นำฟลาสค์ที่บรรจุสารละลายไขมันปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ตัวทำละลายระเหยออกไป แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ปล่อยให้เย็นใน descicator ชั่งหาน้ำหนักไขมันหรือน้ำที่สกัดได้ แล้วนำไปไตเตรทหาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธีการดังนี้

เตรียมตัวทำละลายโดยใช้ไดเอธิลอีเทอร์ 25 มิลลิลิตร รวมกับเอธิลแอลกอฮอล์ 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ไตเตรตตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ (ใช้ด่างประมาณ 2-3 หยด) เทตัวทำละลายผสมที่เป็นกลางลงไปละลายน้ำมันในฟลาสค์ที่ทราบน้ำหนักไขมัน ไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ เขย่าขณะไตเตรทจนกระทั่งได้สีชมพู ซึ่งคงตัวนาน 15 วินาที จดปริมาตรของด่างที่ใช้ จากนั้นจึงนำมาคำนวณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นปริมาณของกรดไขมันอิสระ โดยคำนวณอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดโอเลอิค ซึ่งคำนวณได้จากค่ามาตรฐานดังนี้

1 มิลลิลิตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ทำปฏิกิริยาสมมูลย์พอดีกับกรดโอเลอิค 0.0282 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved