

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 การคำนวณหาค่า D_{10} และสร้างสมการในการคำนวณปริมาณรังสีแกมมาที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมของเชื้อราในโรงเก็บ 1 ชนิด ที่มีความสำคัญมากที่สุด

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว ถั่วเขียว และเมล็ดพืชอาหาร ได้แก่ ถั่วเหลือง และถั่วลิสง มาแยกเชื้อราโดยวิธี blotter method จากนั้นเลือกเชื้อราที่พบการปนเปื้อนมากที่สุดในพืชแต่ละชนิดมาทำการฉายรังสีแกมมา โดยทำการทดสอบการฉายรังสีต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา ดังนี้คือ

ตารางที่ 3.1 เชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพืชอาหาร

ชนิดพืช	เชื้อราในโรงเก็บที่แยกได้
เมล็ดพันธุ์ข้าว	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i>
เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>
เมล็ดถั่วเหลือง	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus</i> sp.
เมล็ดถั่วลิสง	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>

การทดลองที่ 3.1.1 ผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* และการคำนวณหาค่า D_{10}

นำเชื้อราที่พบการปนเปื้อนมากที่สุด คือ *A. flavus* (เมล็ดพันธุ์ข้าว) มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA จากนั้นนำมาฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0-6 กิโลเกรย์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ บันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

จากนั้นนำร้อยละการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ได้มาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดชีวิต (y) และปริมาณรังสี (x) แล้วหาจุดตัดระหว่างแกน x และ y ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ร้อยละ 90 (D_{10}) โดยวิธีการคำนวณค่าทางคณิตศาสตร์ และสร้างสมการในการคำนวณปริมาณรังสีแกมมาประสิทธิภาพในการควบคุมของเชื้อราในโรงเก็บชนิดดังกล่าว

การทดลองที่ 3.1.2 ผลของรังสีแกมมาต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* และการคำนวณหาค่า D_{10}

นำเชื้อราเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำสปอร์มาทำ suspension ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปิเปต suspension ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร Water Agar (WA) เกลี่ยให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาฉายรังสีแกมมา ปริมาณ 0-6 กิโลเกรย์ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.1.1 หลังจากฉายรังสีนำเชื้อรามาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการบันทึกการงอกของสปอร์ ที่เวลา 6 8 และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนสปอร์ทั้งหมด และสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รายงานผลเป็นร้อยละการงอกของสปอร์ โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการงอกของสปอร์} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่งอก}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมด}} \times 100$$

จากนั้นนำร้อยละการงอกของสปอร์ที่ได้มาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดชีวิต (y) และปริมาณรังสี (x) แล้วหาจุดตัดระหว่างแกน x และ y ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ร้อยละ 90 (D_{10}) โดยวิธีการคำนวณค่าทางคณิตศาสตร์ และสร้างสมการในการคำนวณปริมาณรังสีแกมมาประสิทธิภาพในการควบคุมของเชื้อราในโรงเก็บชนิดดังกล่าว

3.2 การทดลองที่ 2 ผลของรังสีแกมมาต่อการปนเปื้อนเชื้อราและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และเมล็ดพืชอาหาร

3.2.1 การทดลองที่ 2.1 ผลของวิธีการปลูกสปอร์เชื้อรา 2 วิธี และปริมาณรังสีแกมมาต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และคุณภาพของเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพืชอาหาร 4 ชนิด

ทำการปลูกเชื้อราในเมล็ดพันธุ์ข้าวและถั่วเขียว ด้วยเชื้อรา *A. flavus* เมล็ดถั่วเหลืองด้วย *Rhizopus* sp. และถั่วลิสงด้วย *A. niger* โดยทำการปลูกเชื้อรา 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 ปลูกเชื้อในเมล็ดโดยคลุกกับเมล็ดบดที่ปนเปื้อนเชื้อรา

นำเมล็ดทั้ง 4 ชนิด ปลูกเชื้อ *A. flavus* ในเมล็ดพันธุ์ข้าวและถั่วเขียว *Rhizopus* sp. ในเมล็ดถั่วเหลือง และ *A. niger* ในถั่วลิสง ด้วย spore suspension ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^5 - 10^6 สปอร์/มล. ปริมาณ 1 มล./ 100 กรัมตัวอย่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 เดือน จากนั้นนำมาบดแล้วคลุกกับเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพืชทั้ง 4 ชนิด ในอัตราส่วน 0.2 กรัมต่อ 200 กรัมตัวอย่าง

วิธีที่ 2 ปลูกเชื้อในเมล็ดด้วยสารละลายสปอร์ (spore suspension)

ใช้สารละลายสปอร์ความเข้มข้นประมาณ 10^5 - 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตร/200 กรัมตัวอย่าง โดยปลูกเชื้อกับเมล็ดแต่ละชนิดตามวิธีที่ 1 จากนั้นบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 1

คืบ แล้วนำไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 และ 3 กิโลเกรย์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 1 เดือน โดยมีชุดควบคุม คือ เมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อ และไม่ฉายรังสี และเมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อ และฉายรังสี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลก่อนฉาย และหลังฉายรังสีเป็นระยะเวลา 1 เดือน ดังนี้

- เมล็ดพันธุ์ข้าว และถั่วเขียว ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา, ความชื้น, ความงอก, ดัชนีการงอก และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

- เมล็ดถั่วเหลือง และถั่วลิสง ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา, ความชื้น, และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.2.2 การทดลองที่ 2.2 ผลของวิธีการปลูกสปอร์เชื้อรา 2 วิธี และปริมาณรังสีแกมมาต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และคุณภาพของเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพืชอาหาร 4 ชนิด ในระหว่างการเก็บรักษา

นำเมล็ดพันธุ์และเมล็ดพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ปลูกเชื้อตามการทดลองที่ 2.1 ไปฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0 3 และ 5 กิโลเกรย์ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยมีชุดควบคุม คือ เมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อ และไม่ฉายรังสี และเมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อ และฉายรังสี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ทำการบันทึกข้อมูลเหมือนการทดลองที่ 2.1 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างก่อนฉายและหลังฉายรังสีเป็นระยะเวลา 2 และ 3 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลก่อนฉายและหลังฉายรังสีเป็นระยะเวลา 1 เดือน ดังนี้

- เมล็ดพันธุ์ข้าว และถั่วเขียว ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา ความชื้น ความงอก ดัชนีการงอก และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

- เมล็ดถั่วเหลือง และถั่วลิสง ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา ความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

บันทึกผลการทดลอง

1. ปริมาณเชื้อราโรงเก็บทั้งหมด โดยวิธี Blotter

นำเมล็ดพืชทั้ง 4 ชนิด จำนวน 50 เมล็ด มาวางบนกระดาษเพาะในกล่องพลาสติก โดยใช้กระดาษเพาะเมล็ด และน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งมาเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปวางที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) นับเมล็ดที่มีเชื้อในวันที่ 4 หลังเพาะ รายงานผลเป็นร้อยละของการปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ด

2. ความชื้น (ISTA, 2008)

ซังเมล็ดที่บดแบบหยาบด้วยเครื่องซังที่มีจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ประมาณ 1 กรัม ใส่ตัวอย่างลงในกระป๋องอะลูมิเนียม แล้วนำตัวอย่างไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ± 2 ชั่วโมง ปิดฝากระป๋องจากนั้นนำไปวางในโถดูดความชื้น (desiccator) จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง ซังน้ำหนักหลังอบ ทดลองอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำมาคำนวณความชื้นของเมล็ดตามสูตร

$$\text{ความชื้นของเมล็ด (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}}$$

3. เปอร์เซ็นต์ความงอก (Germination) (ISTA, 2008)

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวและถั่วเขียว มาเพาะโดยวิธี between paper โดยวางเมล็ดบนกระดาษเพาะ 2 ชั้น จำนวน 50 เมล็ด แล้วปิดทับด้วยกระดาษอีกชั้นหนึ่ง นำไปวางไว้ในตู้เพาะอุณหภูมิกลับ 20/30 องศาเซลเซียส 12/12 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนต้นกล้าปกติของเมล็ดพันธุ์ข้าวในวันที่ 7 และวันที่ 14 และเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในวันที่ 4 และวันที่ 7 หลังเพาะ

4. ดัชนีการงอกของเมล็ด (Germination Index; GI)

นำเมล็ดพันธุ์มาเพาะแบบ Top of paper โดยวางเมล็ดบนกระดาษเพาะในกล่องพลาสติกบันทึกจำนวนต้นกล้าปกติทุกวัน โดยเริ่มตั้งแต่วันที่สังเกตเห็นต้นกล้าปกติจนกระทั่งวันสุดท้ายแล้วนำมาคำนวณตามสูตร

$$GI = \sum \left[\frac{N}{D} \right]$$

เมื่อ N = จำนวนต้นกล้าปกติในวันที่ D

D = จำนวนวันหลังเพาะเมล็ด

5. ปริมาณไขมันทั้งหมด

ซังเมล็ดที่บดแล้วอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ประมาณ 1.5 กรัม และห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปใส่ในทิมเบล (thimble) ที่มีขนาดพอเหมาะกับตัวอย่าง นำทิมเบลจุ่มลงในถ้วยสกัด (ที่อบและซังน้ำหนักไว้แล้ว) ที่ใส่ปิโตรเลียมอีเทอร์เตรียมไว้ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เทค (Soxtec apparatus, TECATOR, Sweden) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. การ boiling เป็นการต้มตัวอย่างที่อยู่ในทิมเบลโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เพื่อสกัดเอาน้ำมันออกจากตัวอย่าง ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 20 นาที
2. การ rinsing เป็นขั้นตอนการชะน้ำมันออกจากตัวอย่างแล้วให้ไหลลงไปในถ้วยสกัดโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ไหลผ่านทิมเบล ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 45 นาที
3. การ evaporation เป็นการระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากตัวอย่าง ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 30 นาที จากนั้นให้นำถ้วยสกัดที่มีลิปิดอยู่ออกจากเครื่องสกัดชอกซ์เทคแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำถ้วยสกัดไปวางให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณไขมัน

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (\%)} = 100 (W_1 - W_2) / W$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของถ้วยรวมกับไขมัน

W_2 = น้ำหนักของถ้วย

W = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)

6. ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid) (ดัดแปลงจาก AOAC, 1995)

การวิเคราะห์หากรดไขมันอิสระของเมล็ดพันธุ์ โดยนำเมล็ดพันธุ์บดละเอียด 10 กรัม ใส่ลงไปในกรวยแยกสาร (separating funnel) เติมน้ำมันเบนซีน (benzene) 25 มิลลิลิตร เขย่าอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปิดสารละลายที่ได้ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมน้ำมันละลายเอทานอลร้อยละ 95 จำนวน 10 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลิน 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำสารละลายไปไตเตรทกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีชมพูจาก นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากรดไขมันอิสระโดย blank คือ เบนซีน 10 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอลร้อยละ 95 จำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำปริมาณ KOH ที่ใช้ในการไตเตรทมาคูณกับแฟกเตอร์ของกรดไขมันโอเลอิก (oleic acid) ตามสูตร

$$\text{การคือน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (กรัม)} = \frac{(100 - A) \times (B)}{100}$$

เมื่อ A = ความชื้นเมล็ดพันธุ์

B = น้ำหนักเมล็ดพันธุ์ตัวอย่าง

$$\text{การคำนวณกรดไขมันอิสระ (mg KOH/100 กรัมตัวอย่าง)} = \frac{(V-B) \times N \times 28.2 \times 2.5}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}$$

เมื่อ	V	=	มิลลิลิตรของสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตรเตรทกับตัวอย่าง
	B	=	มิลลิลิตรของสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตรเตรทกับ blank
	N	=	ความเข้มข้นของสารละลาย KOH
	28.2	=	แฟกเตอร์ในการคำนวณเทียบเป็น oleic acid
	2.5	=	โมลของเบนซีน

7. กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจากวิธีของ Gupta และคณะ, 2002)

ชั่งน้ำหนักเมล็ดพืชแต่ละชนิดที่บดละเอียด 5 กรัม นำมาสกัดโปรตีนด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (18,000 รอบ/นาที่) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีของ Gupta และคณะ (2002) โดย 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (unit/mg protein) หมายถึง ปริมาณของ *p*-nitrophenol (ไมโครโมล) ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสารตั้งต้น *p*-nitrophenylpalmitate ในเวลา 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีของ Bradford (1976)

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดพืชและเมล็ดพันธุ์ หลักสูตรเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สำนักงานวิจัยพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน (อนุเคราะห์เครื่อง Soxtec) และสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) (อนุเคราะห์การฉายรังสีแกมมา)