บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งได้จากการปลูกในสภาพของแปลงขยายเมล็ดพันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ ซึ่งเพาะปลูกในเดือนกรกฎาคมและเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 จำนวน 60 กิโลกรัม มาสุ่มตัวอย่างเพื่อแบ่งเมล็ดด้วยเครื่องแบ่งเมล็ดโดยแบ่งเมล็ดออกเป็น 20 ตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพเริ่มต้นและปรับให้ระดับความชื้นเมล็ดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน มีการวางแผนการทดลองแบบ 4 x 5 Factorial design in Completely Randomize Design โดยมี 2 ปัจจัย คือ
ปัจจัยที่ 1 ระดับความชื้นของเมล็ดพันธุ์ 4 ระดับ คือ 6, 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์
ปัจจัยที่ 2 ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ 5 ระดับ คือ 15, 20, 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องซึ่งเปลี่ยนแปลงตามสภาพภูมิอากาศขณะทำการทดลองจำนวน 20 กรรมวิธี จากนั้นทำการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดผนึกด้วยความร้อนไว้ในสภาพที่ต่างกันนาน 120 วัน จากนั้นทำการบันทึกผลโดยการสุ่มตรวจสอบความมีชีวิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทุก 2 สัปดาห์ ดังนี้

1. ตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (Standard germination test)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพที่ต่างกันทั้ง 20 กรรมวิธี มากรรมวิธีละ 50 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ เพาะเมล็ดลงบนกระดาษเพาะแบบม้วน โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 4 วันตรวจนับต้นอ่อนปกติครั้งแรกและตรวจนับครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

2. ตรวจสอบความแข็งแรงโดยการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor test by Accelerated aging technique)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆทั้ง 20 กรรมวิธีมากรรมวิธีละ 50 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ ใส่ลงในตะแกรงลวดแล้วใส่ลงในขวดเร่งอายุที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร แล้วนำขวดเร่งอายุดังกล่าวเก็บไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำเมล็ดที่ได้มาทดสอบความงอกตามวิธีการทดสอบความงอกมาตรฐาน บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอก

3. ตรวจสอบความมีชีวิตโดยวิธีทางชีวเคมี (Seed viability test by Tetrazolium test)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพต่างกันทั้ง 20 กรรมวิธี มากรรมวิธีละ 50 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ นำเมล็ดมาหุ้มด้วยกระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำเพื่อให้เมล็ดดูดน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสารละลายเตตระโซเลียมที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง ประเมินผลการติดสีของเมล็ดพันธุ์

4. ตรวจสอบความแข็งแรงโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (Electrical conductivity test)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆทั้ง 20 กรรมวิธีมากรรมวิธีละ 25 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ ชั่งน้ำหนักเมล็ดเป็นกรัม นำเมล็ดใส่ลงใน beaker ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 75 มิลลิลิตร แล้วนำ beaker ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงแยกเมล็ดออกจากสารละลายที่ได้ นำสารละลายดังกล่าวมาทำการวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Electroconductivity meter บันทึกค่าการนำไฟฟ้าเป็นไมโครโมส์ (μmhos) แล้วคำนวณค่าการนำ ไฟฟ้าเป็น ไมโครโมส์ต่อกรัมเมล็ด (μmhos/g)

$$\text{ค่าการนำไฟฟ้า } (\mu\text{mhos/g}) = \frac{\text{ค่าที่วัดได้จากเครื่อง Electroconductivity meter}}{\text{น้ำหนัก 25 เมล็ด (g)}}$$

5. อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Seedling growth rate)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆทั้ง 20 กรรมวิธีมากรรมวิธีละ 25 เมล็ดจำนวน 4 ซ้ำ เพาะเมล็ดลงบนกระดาษเพาะแบบม้วน โดยควบคุมแสงและอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วันตรวจนับต้นอ่อนปกติ แล้วนำส่วนของต้นอ่อนไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักแห้งแล้วคำนวณ จาก

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของต้นกล้า (มิลลิกรัมต่อต้นต่อ7วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของต้นกล้า}}{\text{(จำนวนต้นอ่อนปกติ/7วัน)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ตรวจสอบการเกิดเชื้อรา (Fungi infect)

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆทั้ง 20 กรรมวิธีมากรรมวิธีละ 10 เมล็ด จำนวน 4 ซ้ำ นำเมล็ดดังกล่าวฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย Chlorox 10 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งแล้วจึงนำเมล็ดไปเพาะลงบน plate ที่กระดาษเพาะที่ชุ่มน้ำนำไปวางในตู้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วันตรวจนับจำนวนเมล็ดที่เกิดเชื้อราแล้วคำนวณจาก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดเชื้อรา (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$$

7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Protein analysis)

เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนในสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในพืชโดยวิธี Kjeldahl ดังนี้

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายย่อยตัวอย่าง ซึ่งมีส่วนผสมของ K_2SO_4 : $CuSO_4$: $5H_2O$: Metallic selenium ในอัตราส่วน 50 : 10 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วละลายใน conc. H_2SO_4 1 ลิตร สารละลายที่ได้เรียกว่า Digestion Mixture

1.2 สารละลายสำหรับวิเคราะห์

Boric acid 4% : ละลายกรด Boric 40 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

Indicator : - ละลาย Methyl red 1.25 กรัม ใน 95% Ethanol จำนวน 900 มล.

- ละลาย Methylene blue 0.825 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. ผสมเข้าด้วยกัน
- นำ Indicator ผสมกับ Boric acid 4 % อัตราส่วน 1:100

1.3 NaOH 60% : ละลาย NaOH จำนวน 600 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

1.4 HCl 0.1 N

2. การย่อยตัวอย่าง (Digestion)

ชั่งตัวอย่างพืชที่แห้งและบดละเอียดแล้วจำนวน 0.2 กรัมใส่ลงใน100 ml. Kjeldahl flask เติม Digestion Mixture 5 มล. นำไปตั้งบนเตาย่อยในตู้ดูดควัน ค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจนกระทั่งได้สารละลายใส (ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3. การกลั่น (Distillation)

เทสารละลายที่ย่อยได้ลงในเครื่องกลั่นให้หมดใช้น้ำกลั่นล้างซ้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นเติม NaOH 60% 10 มล. และใส่ส่วนผสม Indicator 10 มล. ลงใน Erlenmeyer flask นำเอา Flask ไปวางไว้ใต้ปลายเครื่องควบแน่นอยู่ใต้ผิวระดับของสารละลายใน Flask กลั่นประมาณ 7 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วปล่อยสารละลายในเครื่องควบแน่นหยดลงใน Flask ให้หมด จากนั้นล้างปลายเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่น

4. การไตเตรท (Titration)

นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรทด้วย HCl 0.1 N บันทึกจำนวน มล.ของ HCl

5. การคำนวณ

$$\% N = \frac{(\text{Sample titer} - \text{Blank titer}) \times N \text{ of HCl} \times 14 \times 100}{\text{Sample weight} \times 1000}$$

% โปรตีน = % N x 6.25 (Yoshida, 1976)

8. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Lipid analysis)

1. นำตัวอย่างที่ละเอียดและอบแห้ง 3-5 กรัม ห่อในกระดาษกรองไขมันแล้วบรรจุในลง Extraction thimble จากนั้นนำใส่ลงในหลอดที่ต่อเข้ากับ Condenser

2. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่ได้อบแห้งแล้ว (อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติม Dichloromethane ลงในขวดก้นกลมประมาณ ¾ ขวด ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น

3. เปิด Hotplate ให้อุณหภูมิสูงพอที่จะกลั่นสารละลายให้ไหลกลับลงในขวด 15 รอบ/ชั่วโมง กลั่นนาน 5-8 ชั่วโมง หรือดูจากไขมันถูกชะออกจาก thimble ลงมาในขวดจนหมด

4. เอา thimble ออกแล้วกลั่นต่อจน Dichloromethane กลับขึ้นมาอยู่บนหลอดเกือบหมด ส่วนที่เหลือเทออกเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป ส่วนที่เหลือในขวดก้นกลมคือ ไขมันที่สกัดได้

5. ตั้งขวดทิ้งไว้บน Hotplate นาน 1 คืน แล้วนำเข้าตู้อบ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นใน Desicator

6. ชั่งน้ำหนักของขวดที่เพิ่มขึ้นหลังกลั่นแล้วคือ น้ำหนักของ Crude Fat

7. การคำนวณ

$$\% \text{ ไขมันของน้ำหนักแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน (แห้ง)}}{\text{น้ำหนักวัตถุ (แห้ง)}} \times 100$$

โดยที่ค่าตัวอย่างมีไขมันอยู่ในช่วง 0.4-100 % และค่าที่วิเคราะห์ได้ จากตัวอย่างเดียวกันต้องต่างกัน $\pm$ 0.4 หน่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate analysis)

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 Anthrone reagent : ชั่ง Anthrone 1 กรัม เติม conc. H_2SO_4 ให้ครบ 500 มล. แล้วห่อด้วย Aluminum foil และเก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 80 % Ethanol

1.3 Perchloric acid 9.2 N : เจือจาง 793 มล. ของ 70 เปอร์เซ็นต์ $HClO_4$ ให้เป็น 1 ลิตร

1.4 Perchloric acid 4.6 N : เจือจาง 397 มล. ของ 70 เปอร์เซ็นต์ $HClO_4$ ให้เป็น 1 ลิตร

2. การย่อยตัวอย่าง (Digestion)

2.1 ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม (100 mg) แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวใส่ลงใน tube เติม 80 % Ethanol 20 ml. เพื่อสกัดเอาน้ำตาลและแป้งออกมา โดยนำไปวางบน water bath ที่มีอุณหภูมิสูง 80 – 85 °C นาน 1 ชั่วโมง

2.2 นำกากที่กรองได้อบที่ 80 °C นาน 4-5 ชั่วโมง

2.3 เติมน้ำกลั่น 2 ml ลงใน tube จากนั้นนำมาวางบน water bath ที่มีอุณหภูมิสูง 100 °C นาน 15 นาที คนเป็นครั้งคราวแล้วทิ้งหลอดไว้ให้เย็น

2.4 เติม 2 ml ของ 9.2 N $HClO_4$ พร้อมคนไปด้วย นาน 15 นาที จากนั้นส่วนผสมจะถูกทำให้มีปริมาตร 10 ml. แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 200 rpm นาน 15-20 นาที

2.5 รวบรวมส่วนใสแล้วเติม 2 ml ของ 4.6 N $HClO_4$ ลงในส่วนที่เหลือ พร้อมคนไปด้วย นาน 15 นาที แล้วปรับให้มีปริมาตร 10 ml.ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 200 rpm นาน 15-20 นาที อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นรวบรวมส่วนใสปรับด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ให้มีปริมาตร 50 ml.

2.6 ดูดสารละลายตัวอย่างที่สกัดและเจือจางใสแล้วมาจำนวน 5 ml ลงในหลอดทดสอบและหลอดที่มีมาตรฐานลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม 10 ml ของสารละลาย Anthrone ลงในแต่ละหลอดอย่างช้าๆ คนด้วยแท่งแก้วเป็นระยะ

2.7 นำหลอดทดสอบไปวางบน water bath ที่มีน้ำเดือดนาน 7.5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่า OD ที่ 630 นาโนเมตร

3. การเตรียม Standard glucose เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

3.1 ชั่ง glucose 1 กรัมแล้วเติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 1000 ml จากนั้นดูดมา 10 ml (ปริมาณ glucose 0.1g) เพื่อปรับความเข้มข้นจาก glucose 0.1 g ให้เป็นปริมาตร 1000 ml นั่นคือ 100 ppm glucose และเตรียมความเข้มข้นของ glucose ต่างๆกัน

3.2 นำ standard glucose แต่ละความเข้มข้นวางบนอ่างน้ำเติม 10 ml ของสารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Anthrone คนด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน

3.3 นำหลอดทั้งหมดวางบน water bath ที่มีน้ำเดือดนาน 7.5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นจึงนำไปวัดค่า OD ที่ 630 นาโนเมตร

3.4 นำค่าที่ได้ไป plot standard curve ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลจากการตรวจสอบความมีชีวิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD (Least Significant Difference) (Stell and Torrie, 1960) และนำค่าดังกล่าวมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์และการถดถอย (Regression Analysis) เพื่อหาสมการสำหรับการคาดคะเน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved