บทที่ 3
ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์ NK 40 จากบริษัท ซินเจนทา สีด จำกัด (Syngenta co. Ltd.) เก็บเกี่ยวเดือนตุลาคม 2549 เก็บรักษาที่ห้องเย็นภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. เชื้อรา *Aspergillus flavus* เลี้ยงเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ Micrology สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. เครื่อง Radio Frequency สร้างและปรับปรุงโดย Institute of Agriculture Engineering, University of Göttingen ห้อง Radio Frequency สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่มีเชื้อรา *A. flavus* ปรับความชื้นเป็น 12.0 % ฐานเปียก (Wet basis) ให้คลื่นความถี่วิทยุ Radio Frequency โดยใช้กำลังเครื่องที่ ความถี่ 27.12 MH_Z ระดับพลังงานเริ่มต้น 1,000 วัตต์ น้ำหนักเมล็ด 450 กรัม วางแผนการทดลองแบบ Split-plot in RCB โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ระยะเวลาในการปล่อยพลังงานแก่เมล็ด 5 ระยะเวลา ได้แก่ 4, 5, 6, 7, 8 นาที

ปัจจัยที่ 2 ระดับความร้อนจากการให้พลังงานแก่เมล็ด 4 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 50, 60, 70 และ80 °C

ใช้จำนวนซ้ำของตัวอย่าง 10 ซ้ำ ต่อกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

1.ปรับความชื้นเมล็ดให้อยู่ในระดับ 14.0 % ซึ่งเป็นระดับความชื้นเมล็ดก่อนการบรรจุและเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ ใช้การคำนวณ%ความชื้นจากน้ำหนักแห้งเมล็ดเพื่อปรับปริมาณน้ำในเมล็ด

2.ทำการปลูกถ่ายเชื้อ *A.flavus* โดยใช้ spore suspension ความเข้มข้น 1 x 10^6 ต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม คลุกให้ทั่วผิวเมล็ด ทำการปรับความชื้นให้อยู่ในระดับ 12% wb. เมื่อทำการปรับปริมาณน้ำแล้ว บรรจุเมล็ดในเครื่องเขย่า (Shaker) โดยเขย่าเมล็ดทุกๆชั่วโมง ครั้งละ2นาที เพื่อให้เมล็ดมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ และไม่ให้เมล็ดมีการกระทบกันมากเกินไป

3.บ่มเชื้อราในเมล็ดภายในเครื่องเขย่า 16-24 ชั่วโมง เพื่อให้มีการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ครบทุกระยะ

4.นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ปลูกถ่ายเชื้อ และบ่มแล้ว ไปทำการทดลองในเครื่อง RF

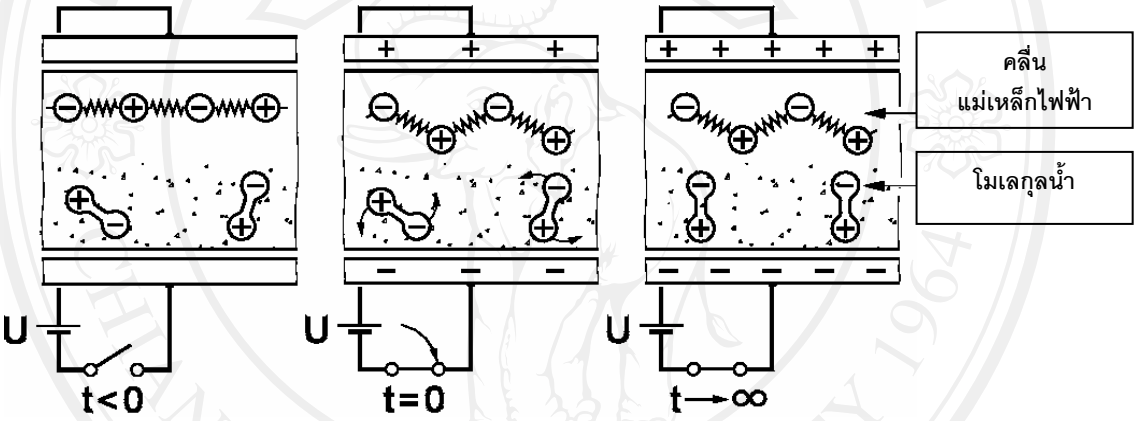
5.วัดผลการทดลอง

6.ทุกกระบวนการทดลอง ต้องมีการทำปลอดเชื้อโดยฉีดแอลกอฮอล์ทุกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 กระบวนการเกิดความร้อนโดยเครื่อง Radio Frequency

เมล็ดพืชมีความสามารถในการนำพลังงานไฟฟ้าที่ต่ำ เมื่อมีการปล่อยพลังงานที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงผ่านเข้าไปแบบไฟฟ้ากระแสสลับที่ความถี่ 27.12 MH_z หรือ 27,120,000 ครั้งต่อวินาที ผลที่เกิดขึ้นคือ จะมีการเหนี่ยวนำจนเกิดการสั่นสะเทือนตามความถี่ และในวัตถุที่มีพันธะโมเลกุล 2 ขั้ว เช่น น้ำ ที่มีพันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ เมื่อโมเลกุลขวางทิศทางของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า จะเกิดการสั่นสะเทือน **(ภาพที่3.1)** ความถี่ในการสั่นจะขึ้นอยู่กับ ความถี่ของคลื่นวิทยุที่ใช้ การสั่นสะเทือนจะเกิดขึ้นจนกระทั่งเกิดการสะสมพลังงาน เป็นการเพิ่มอุณหภูมิจากภายในโมเลกุลจากกระบวนการ Intermolecular friction และ Hysteresis

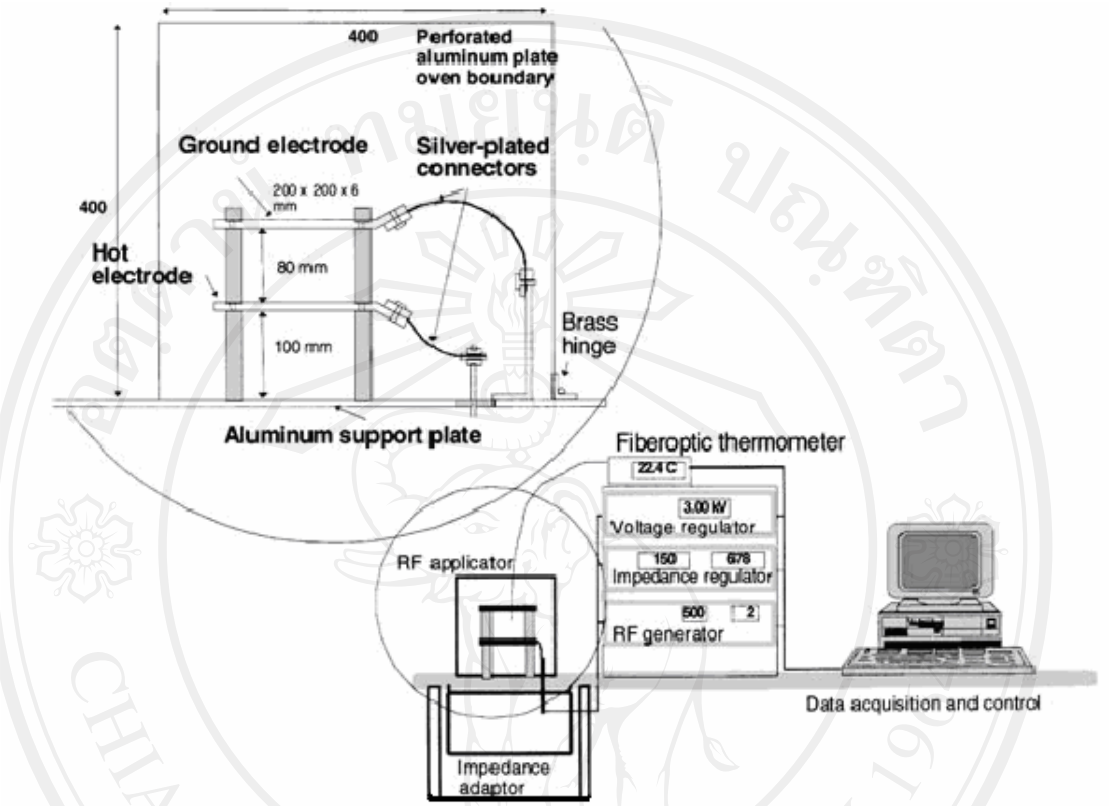


ภาพที่ 3.1 กระบวนการสั่นสะเทือนของโมเลกุลน้ำจนเกิดความร้อน (Cwiklinski, 2001)

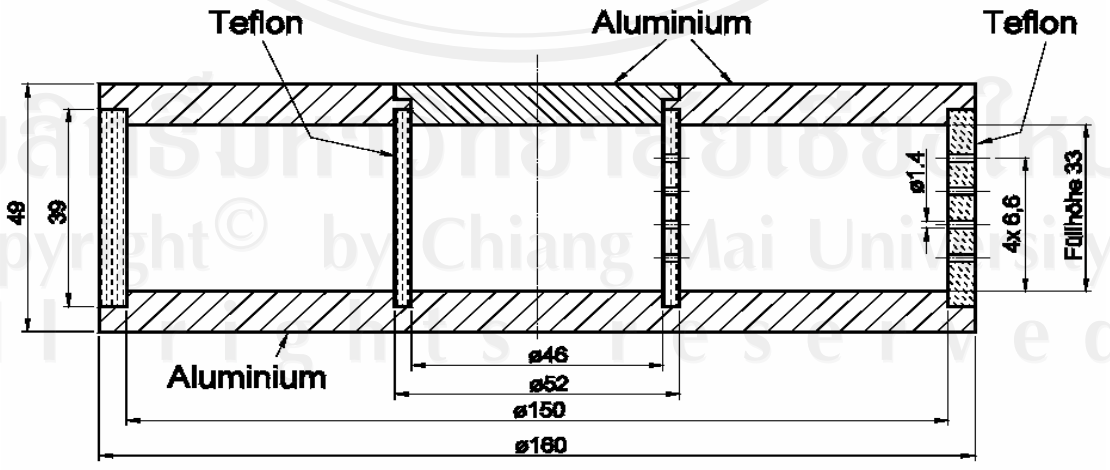
แรงเสียดทานภายในระหว่างโมเลกุลของน้ำที่อยู่ระหว่างช่องว่างภายในเมล็ด ทำให้เกิดความฝืดระหว่างอนุภาค ผลที่ได้คือ ความร้อนจะเกิดขึ้นตรงโมเลกุลของน้ำ ความร้อนที่สูงกว่าจุดอื่นภายในเมล็ดนี้ จะเกิดการถ่ายเทความร้อน (Heat Transfer) ในระบบของเครื่อง Radio Frequency ความร้อนที่เกิดขึ้นจะมีการถ่ายเทความร้อนแบบนำความร้อน ซึ่งเป็นการถ่ายเทพลังงานในรูปของอนุภาค ผ่านตัวกลางที่ไม่มีการเคลื่อนที่ เช่นของแข็ง หรือของเหลวที่มีความหนืดสูง โดยที่ความร้อนจะเริ่มเกิดขึ้นที่น้ำในเมล็ดก่อน หลังจากนั้นความร้อนจากน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่าจะมีการถ่ายความร้อนไปสู่จุดที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าเพื่อรักษาสมดุลของอุณหภูมิ (Equilibrium Temperature) จนถึงระดับความร้อนที่ต้องการ (Target Temperature)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การทำงานของเครื่อง RF



ภาพที่ 3.2 ระบบการทำงานของเครื่อง Radio Frequency (Cwiklinski, 2001)



ภาพที่ 3.3 โครงสร้างภาชนะบรรจุเมล็ด (Containers) (Cwiklinski, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3.4 เครื่อง Radio Frequency

จะเห็นว่าตรงขั้วไฟฟ้าโลหะรูปสี่เหลี่ยมที่ทำการปล่อยพลังงานจากเครื่อง RF **(ภาพที่3.4)** ของบริษัท Sairem นั้นจะส่งผ่านพลังงานไปยัง Electrode Plate ขนาด กว้าง 350 มิลลิเมตร ยาว350 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีระบบการให้ความร้อนด้วยน้ำร้อน **(ภาพที่3.5)** ที่มีการปรับระดับอุณหภูมิได้ระหว่าง 30-100 องศาเซลเซียส เนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิ หากไม่มีการปรับอุณหภูมิของแผ่น Electrode Plate ให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิของเมล็ดภายในภาชนะ ในระหว่างการปล่อยพลังงานเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดหยดน้ำจากการควบแน่น (Condent) อันเนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างเมล็ดพืชกับฝาอลูมิเนียมของภาชนะบรรจุเมล็ด ในขณะที่มีการให้พลังงานด้วย Radio Frequency ฝาปิดอลูมิเนียมทั้งด้านบนและด้านล่างของ ภาชนะบรรจุเมล็ด (Containers) **(ภาพที่3.6)**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องทำน้ำร้อน

ระบบน้ำร้อน

ภาพที่ 3.5 ระบบน้ำร้อนในการหล่อเลี้ยงอุณหภูมิแผ่น Electrode ในเครื่อง RF

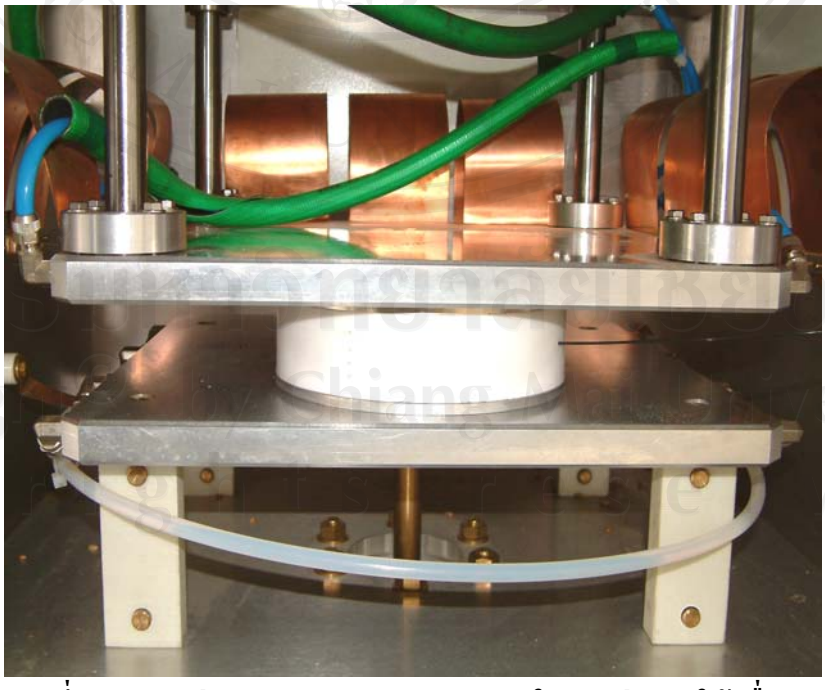
ไม่มีระบบน้ำร้อน มีระบบน้ำร้อน

ภาพที่ 3.6 เปรียบเทียบการเกิดหยดน้ำที่ฝา Container

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3.7 ภาชนะบรรจุเมล็ด (Containers) และตำแหน่งของสาย fiber optic

ส่วนของทรงกระบอกของภาชนะบรรจุเมล็ดตัวอย่าง ทำจาก เทฟลอน (Teflon) ที่มีความต้านทานไฟฟ้าสูง ไม่มีการดูดซับพลังงานจาก RF และฝาปิดด้านบนและด้านล่าง ทำจากอลูมิเนียม ที่มีความสามารถในการนำไฟฟ้าสูง **(ภาพที่ 3.7 และ3.8)**

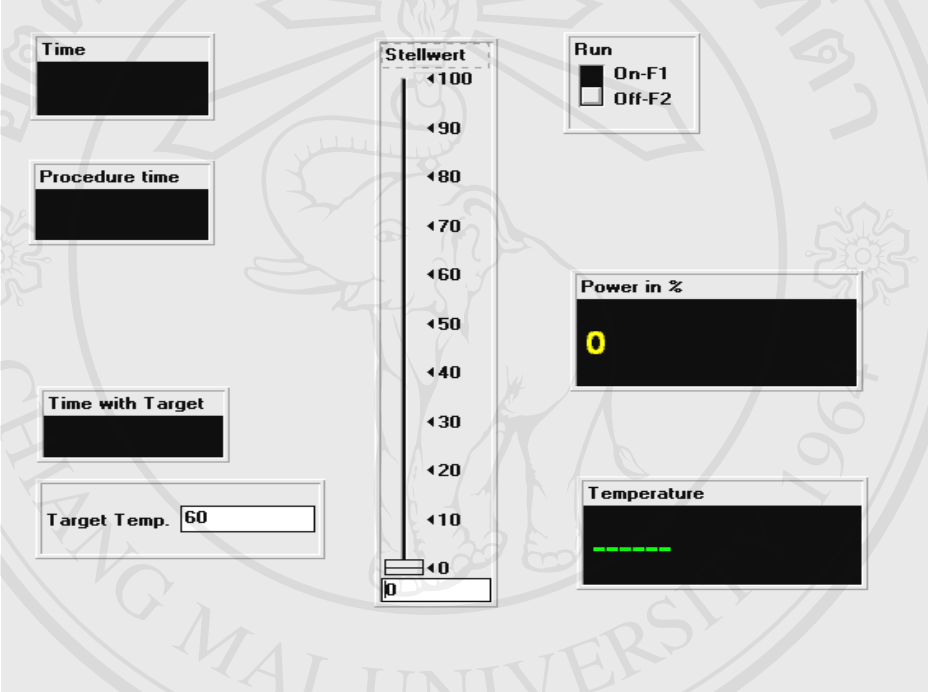


ภาพที่ 3.8 ตำแหน่งของ Container บรรจุเมล็ด ในระหว่างการให้คลื่น RF

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การควบคุมเครื่อง RF โดยการใช้โปรแกรมควบคุมอัตโนมัติ Penel 1

ในการปล่อยพลังงานเข้าไปในเมล็ด พลังงานจะไหลผ่านจากขั้วไฟฟ้าโลหะ แล้วไหลผ่านไปยังฝาด้านบนและล่างของ ภาชนะบรรจุเมล็ดทั้งหมด ซึ่งพลังงานที่มีการไหลผ่านเมล็ดที่บรรจุภายในภาชนะบรรจุเมล็ดจนเต็มนั้น เมล็ดจะมีการสัมผัสกับฝาปิดอลูมิเนียม ทั้งด้านบน และด้านล่างซึ่งเมล็ดจะได้รับพลังงานทั้งหมดจะส่งผ่านมาจาก เครื่อง RF Generator ตามที่ควบคุมบนหน้าจอแสดงผลของเครื่องคอมพิวเตอร์ ที่ใช้โปรแกรมควบคุมแบบอัตโนมัติ Panel 1 **(ภาพที่3.9)**



ภาพที่ 3.9 โปรแกรมควบคุมการทำงานของเครื่อง Radio Frequency Panel 1

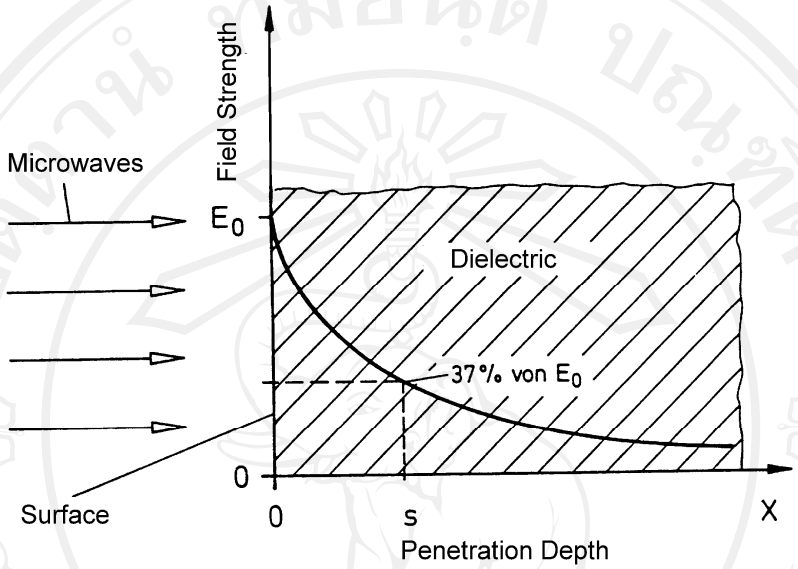
การแสดงผลบนหน้าจอคอมพิวเตอร์

Time	เวลา
Procedure time	ระยะเวลาในการให้พลังงาน จะเริ่มนับตั้งแต่เปิดสวิทซ์
Time with target	ระยะเวลาที่วัสดุในภาชนะมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิเป้าหมาย
Target temp.	อุณหภูมิเป้าหมาย
Stellwert	ระดับพลังงาน % RF power
Run	สวิทซ์ เปิด/ปิด
Power in %	ระดับพลังงานในขณะนั้น
Temperature	อุณหภูมิในขณะนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การให้พลังงาน

เครื่อง RF มีกำลังสูงสุดของเครื่องอยู่ที่ 2,720 วัตต์ ในระดับ 100% แต่ในการให้พลังงานในการทำวิจัยนี้จะใช้พลังงาน 36% หรือประมาณ 1,000 วัตต์ ซึ่งเป็นระดับพลังงานที่เหมาะสมที่จะให้กับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ความชื้น 14% dry basis



ภาพที่ 3.10 ความสามารถในการดูดซับพลังงาน RF ของเมล็ดข้าวโพด

ในการให้พลังงาน ในตอนแรกจะให้พลังงานที่ 36% หรือ 1,000 watt ซึ่งเป็นระดับพลังงานที่มีความเหมาะสมกับพื้นที่สัมผัสแผ่นฝามิเนียมของภาชนะบรรจุเมล็ด (Container) ความลึก ของชั้นความสูงเมล็ดในภาชนะบรรจุเมล็ด และระดับของสนามพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าที่ใช้ในการส่งผ่านเข้าไปในเมล็ด ซึ่งต้องมีการทดสอบทำการให้พลังงานก่อนหลายครั้งจึงจะทราบค่าพลังงานนี้ แต่เนื่องจากในโปรแกรมควบคุมอัตโนมัติ Penel 1 ค่าของ % RF power จะเป็นเลขคู่ จึงทำการเลือกใช้พลังงานที่ใกล้เคียงและไม่เกินกว่าค่าที่เหมาะสมที่ 37 % นั่นคือที่ 36 % **(ภาพที่3.10)**

จนกระทั่งก่อนที่อุณหภูมิของเมล็ดจะถึง อุณหภูมิเป้าหมาย จะทำการค่อยๆลดพลังงานลงโดยการบังคับด้วยมือ (Manual control) มาเรื่อยๆจนเป็น 0% ในขณะที่อุณหภูมิของเมล็ดในภาชนะเท่ากับอุณหภูมิเป้าหมาย หลังจากนั้น อุณหภูมิจะมีความเสถียรในระยะเวลาหนึ่ง จนกระทั่งมีการลดอุณหภูมิลง เราจะทำการให้พลังงานเพียงเล็กน้อย เพียง 2 - 4 % RF power หรือ 55 - 110 watt เพื่อให้อุณหภูมิของเมล็ดในภาชนะ เท่ากับอุณหภูมิเป้าหมาย ตลอดระยะเวลาในการให้พลังงานแก่เมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมเครื่องในการให้ RF แก่เมล็ด

1. เปิดวาล์วน้ำหล่อเย็น เครื่อง RF Generator
2. เปิดวาล์วแรงดันลม
3. เปิดสวิทซ์หลัก Main switch บนเครื่อง RF Generator
4. เปิดคอมพิวเตอร์ควบคุม RF และเปิดโปรแกรม Panel 1
5. เปิดระบบน้ำร้อนตั้งอุณหภูมิ และระบบหมุนเวียนน้ำร้อน รอจนกระทั่งอุณหภูมิคงที่
6. เตรียม container และ fiber optic ให้อยู่ในตำแหน่ง
7. ชั่งน้ำหนักเมล็ดที่เตรียมไว้ 450 กรัม บรรจุลงใน container
8. ตั้งโปรแกรม Panel อุณหภูมิเป้าหมาย (Target temperature) ระดับพลังงาน % RF power
9. บรรจุ container ที่มีเมล็ด ในเครื่อง RF Applicator
10. เปิดสวิทซ์ลมเพื่อเลื่อนแผ่น electrode ประกบ container จนสนิท ปิดฝาเครื่อง RF Applicator
11. กดปุ่ม on บน โปรแกรม Panel 1
12. เมื่อใกล้ถึงอุณหภูมิเป้าหมาย ค่อยๆลดระดับพลังงาน % RF powerจนกระทั่งเหลือ 0% ก่อนที่จะถึงอุณหภูมิเป้าหมายเล็กน้อย
13. ทำการรักษาระดับอุณหภูมิระหว่างการให้RF โดยการเพิ่ม % RF power เพียงเล็กน้อย เพื่อไม่ให้ อุณหภูมิของเมล็ดต่ำกว่าอุณหภูมิเป้าหมาย
14. เมื่อครบระยะเวลาในการให้ RF กดปุ่ม off เพื่อหยุดการให้พลังงานแก่เมล็ด
15. ยกแผ่น electrode โดยปิดสวิทซ์ลม เปิดฝาเครื่อง RF Applicator นำ container ออกมา
16. เปิดฝา container นำเมล็ดออกมาจาก container บรรจุในถุงพลาสติก

หมายเหตุ ทำการรักษาความสะอาดแบบ Aseptic technique ทุกขั้นตอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การวัดอุณหภูมิ

การวัดอุณหภูมิภายในภาชนะบรรจุเมล็ดโดยใช้เส้นใยแก้วนำแสง Fiber Optic ของ FISO Technology รุ่น UMI Signal Conditioner ขนาด 0.8 มิลลิเมตร ผ่าน โปรแกรมคอมพิวเตอร์ FISO Commander ที่มีการแสดงผลด้วยจอแสดงผล แบบ 4 ช่องสัญญาณ Model 750 ซึ่งจะสามารถวัดอุณหภูมิได้ในช่วง -40 ^{o}C ถึง 250 ^{o}C มีความละเอียดในการวัด ทศนิยม 2 ตำแหน่ง หรือ 0.01 เคลวิน (K) ทำการวัดอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงทุกๆ 0.05 เคลวิน ความถี่ในการวัดอุณหภูมิ 4 ครั้งต่อวินาที และมีค่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิ $\pm$ 0.1เคลวิน ซึ่งในระหว่างการปล่อยพลังงานสู่เมล็ดพืช ก็จะทำการวัดอุณหภูมิในขณะนั้นไปด้วย ในการแสดงผลจะมีการแสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ผ่านโปรแกรม Panel 1 ซึ่งจะเป็นอุณหภูมิที่วัดได้จาก Fiber Optic เส้นที่ 3 ที่มีการวางไว้ที่จุดกึ่งกลางภายในภาชนะบรรจุเมล็ด ซึ่งอุณหภูมิภายในจะมีความเสถียรมากที่สุด (Homogenous Temperature) ในการวัดอุณหภูมิภายในภาชนะบรรจุเมล็ดแต่ละครั้ง จะใช้เส้นใยแก้วนำแสง Fiber Optic ทั้งหมด 4 เส้น วัดแต่ละจุด กระจายตามจุดต่างๆ เพื่อให้ครอบคลุมทุกๆตำแหน่งที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิมากที่สุด โดยตำแหน่งต่างๆของเส้นใยแก้วนำแสง Fiber Optic จะมีการวางตำแหน่งดังนี้ **(ภาพที่ 3.11)**

เส้นที่ 1 ตรงกลางด้านบนห่างจากฝาภาชนะ 0.5 เซนติเมตร

เส้นที่ 2 ตรงกลางด้านล่างห่างจากก้นภาชนะ 0.5 เซนติเมตร

เส้นที่ 3 ตรงกลางของภาชนะ อุณหภูมิจะมีความเสถียรมากที่สุด

เส้นที่ 4 ส่วนติดขอบภาชนะบรรจุเมล็ดห่างจากผิวด้านข้าง 0.5 เซนติเมตร

ภาพที่ 3.11 การบรรจุเมล็ดในภาชนะบรรจุในเครื่อง RF

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

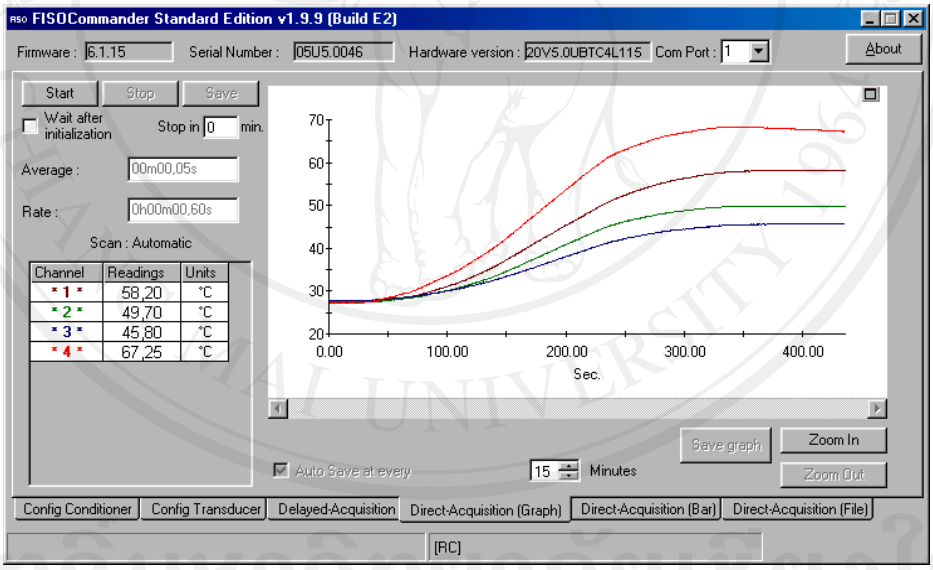
ความคลาดเคลื่อน (Error) ของการวัดอุณหภูมิ

สามารถตรวจสอบความคลาดเคลื่อนโดยใช้โปรแกรม FISO Commander Standard Editionversion1.9. ที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจสอบซึ่งเป็นการอ่านค่าได้แล้วรายงานออกมาเป็นกราฟอุณหภูมิได้ **(ภาพที่ 3.12)** การวัดอุณหภูมิด้วย Fiber optic มีความคลาดเคลื่อนได้จากการสัมผัสกับผิวเมล็ด ดังนั้น ในระหว่างการทดลองจึงต้องพยายามให้มีช่องว่างระหว่างปลาย fiber optic กับเมล็ดข้าวโพดให้เกิดช่องว่างน้อยที่สุด **(ภาพที่3.13)**

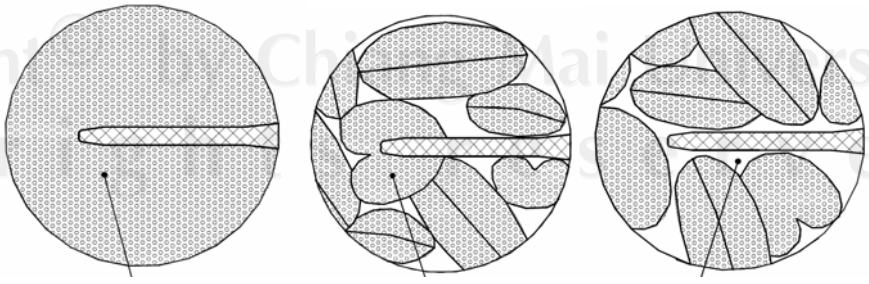
A ปลายสาย Fiber Optic สัมผัสเมล็ดทั้งหมด อุณหภูมิที่วัดได้จะเป็นอุณหภูมิของเมล็ดที่แท้จริงมีค่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิ $\pm$ 1.00 เคลวิน

B ปลายสาย Fiber Opticสัมผัสเมล็ดบางส่วน อุณหภูมิที่วัดได้จะเป็นอุณหภูมิต่ำกว่าเป็นจริงเล็กน้อยมีค่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิ $\pm$ 2.30 เคลวิน

C ปลายสาย Fiber Opticไม่สัมผัสกับเมล็ด อุณหภูมิที่วัดได้จะเป็นอุณหภูมิจะต่ำกว่าเป็นจริงมากมีค่าความคลาดเคลื่อนของอุณหภูมิ $\pm$ 3.70 เคลวิน



ภาพที่ 3.12 กราฟแสดงอุณหภูมิโดยโปรแกรม FISO Commander Standard Editionversion1.9.9



A **B** **C**

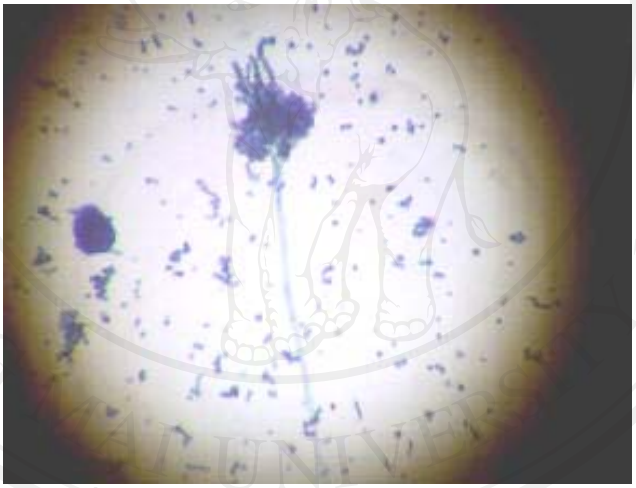
ภาพที่ 3.13 ตำแหน่งของปลายสาย Fiber Optic ที่วัดอุณหภูมิของเมล็ดภายในภาชนะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7 การเพาะเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การเตรียมเชื้อรา *A. flavus*

นำเมล็ดข้าวโพดจากโรงเก็บที่มีการเข้าทำลายโดยเชื้อรา *A. flavus* โดยดูจากมีเส้นใยสีเหลือง อมเขียว ขึ้นบริเวณฝัก นำเมล็ดข้าวโพดไปทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) เก็บไว้ในตู้เลี้ยงเชื้อ (Incubator) ที่มีการควบคุมสภาพบรรยากาศตลอดเวลา อุณหภูมิ 35 °c เปิดแสง12 ชั่วโมง ปิดแสง 12 ชั่วโมงนาน 7 วัน จะมีเส้นใยเชื้อราเจริญขึ้นบนผิวเมล็ดข้าวโพด ทำการแยกเฉพาะเชื้อรา *A flavus* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) เขี่ยเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยสีเหลืองอมเขียว แล้วนำมาจิ้มลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า เก็บไว้ในตู้เลี้ยงเชื้ออีกครั้ง คัดเฉพาะจานเลี้ยงเชื้อที่มีสีเหลืองอมเขียวเท่านั้น ตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ **(ภาพที่3.14)** จากการตรวจสอบสปอร์ของเชื้อ แล้วเก็บไว้เพื่อใช้ต่อไป



ภาพที่ 3.14 เชื้อรา *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา (Spore Suspension)

นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์เชื้อราของ *A. flavus* มาเติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อย แกว่งให้ทั่วจาน แล้วเทลงในขวดแก้วรูปชมพู่ ด้านบนมีกรวยแก้วพร้อมกระดาษกรอง เบอร์ 4 กรองเอากากออก รวบรวมสารละลายและนำมาตรวจสอบหาความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา โดยใช้ Hemacyto meter ขนาดความลึก 0.100 มิลลิเมตร ขนาดตารางความละเอียด 0.0025 ตารางมิลลิเมตร มาใช้ในการปรับความเข้มข้นให้ได้ $1x10^6$ สปอร์ต่อ100 มิลลิลิตร เก็บในที่อุณหภูมิไม่เกิน 15 °C นานไม่เกิน 1วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7.2 การปลูกถ่ายเชื้อลงบนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

เตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 5 กิโลกรัมมาทำความสะอาด โดยใช้เครื่อง Air screen cleaner แล้วนำไปลดความชื้นในตู้อบลดความชื้น อุณหภูมิ 35 °C นาน 2 วัน เพื่อให้มีความชื้นเมล็ดที่ต่ำลงกว่า 14.0 % นำเมล็ดหลังลดความชื้นไปล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ NaHCl ความเข้มข้น 0.1 % นาน 1 นาทีล้างด้วยน้ำกลั่นจนหายกลิ่น นำเมล็ดข้าวโพดใส่ลงในถังแล้วเติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา (Spore Sustention) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วย้ายเมล็ดข้าวโพดไปในเครื่องเหวี่ยงแบบหมุน (Shaker V Type Mixer) หมุนเพื่อคลุกเมล็ดและสารละลายสปอร์เชื้อราให้เข้ากัน โดยเปิดสวิทซ์ทุกๆ 1 ชั่วโมง ครั้งละ 1 นาที ใช้เวลาทั้งหมด 16 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อรามีครบทุกระยะการเจริญ (Fungi Growth Stage) เทเมล็ดออกจากเครื่องเหวี่ยง บรรจุในถังฝาปิดสนิท ตรวจวัดหาความชื้นเพื่อเตรียมปรับสภาพความชื้นต่อไป

3.8 การปรับความชื้นเมล็ดพันธุ์

ปรับระดับความชื้นให้อยู่ในระบบฐานเปียก (Wet Basis) ในการทำวิจัยนี้จะปรับระดับความชื้นให้อยู่ที่ 12.0 % wb และจะต้องให้มีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด เพราะความชื้น เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างความร้อน โดยเครื่อง RF การปรับความชื้นจะมีการปรับอยู่ 2 ลักษณะ ได้แก่

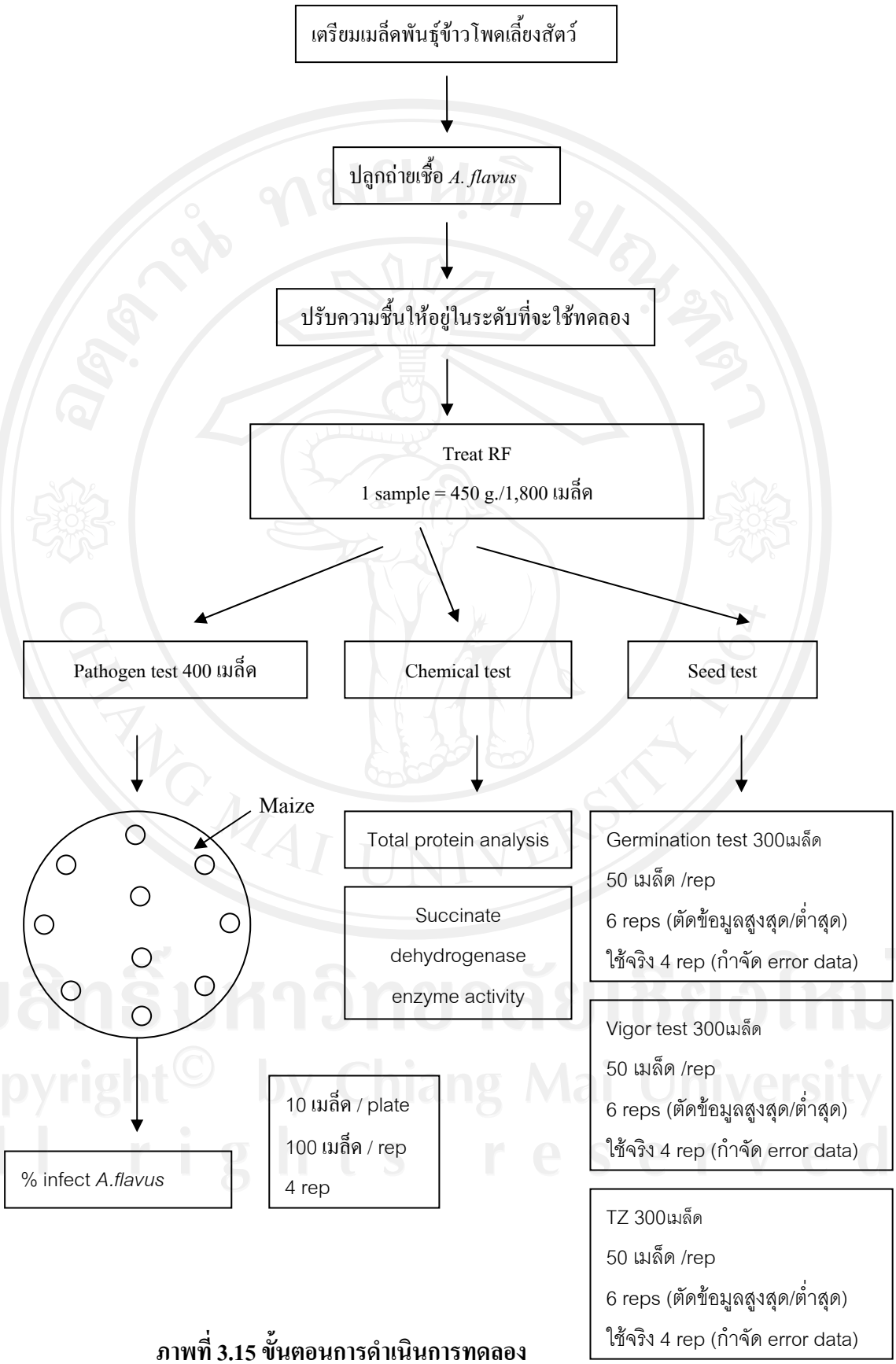
การลดความชื้น จะใช้วิธีการคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องนำออกจากเมล็ดโดยการอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 35 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ปลอดภัยต่อองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ด

การเพิ่มความชื้น จะใช้วิธีการคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงในเมล็ด และเติมโดยใช้วิธีการสเปรย์น้ำกลั่นลงไปพร้อมกับการคลุกเมล็ดทุกๆครั้ง

โดยในการปรับความชื้น เราจะต้องทราบความชื้นเบื้องต้นก่อนการปรับความชื้น และทราบน้ำหนักของเมล็ดขณะนั้น เราจะทำการคำนวณจากสมการความชื้น เพื่อหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมเข้าไปในกรณีความชื้นต่ำกว่าที่ต้องการ หรือ ปริมาณน้ำที่ต้องนำออกเมื่อความชื้นเกินกว่าที่ต้องการ โดยใช้วิธีการชั่งน้ำหนัก เนื่องจาก น้ำ 1 กรัมมีปริมาตร1 มิลลิลิตร

หลังจากที่ทำการปรับระดับน้ำในกองเมล็ดเสร็จแล้วก็จะมีการบรรจุลงในถังอีกครั้ง ปิดฝาให้สนิท แล้วเก็บไว้ในที่เย็น อุณหภูมิ 15 °C เพื่อไม่ให้เชื้อรามีการเจริญเติบโต และ เป็นการทำให้ความชื้นภายในกองเมล็ด มีการปรับระดับให้สู่จุดสมดุลความชื้น (Equilibrium Moisture Content) ใช้เวลา 2 วัน เมล็ดก็จะพร้อมที่จะนำมาใช้ทำการทดลองได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.15 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.4 ระยะเวลาการทำงาน ต่อ 1 Treatment

วันที่	เช้า	บ่าย	กลางคืน
1.	เตรียมเมล็ด/ เครื่อง RF	Treat RF 30 min./1rep 10 rep = 5 hr.	Pathogen test ,แช่เมล็ดในน้ำ เตรียมย้อม TZ
2.	ผ่าเมล็ด ย้อม TZ เช็คผลการย้อมสี	Germination test ,Vigor test ,เก็บตัวอย่างเมล็ดสำหรับการวิเคราะห์เคมีไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
3.			
4.			
5.			
6.			
7.	ตรวจผล Pathogen test	First count Germination test ,Vigor test	
8.			
9.		Final count Germination test ,Vigor test	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9 การวัดผลการทดลอง

3.9.1 การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อรา *A .flavus*

ทำการทดสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDAโดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์มาจำนวน 400 เมล็ด มาวางบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ10 เมล็ด ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในตู้ Incubator นาน 7 วัน บันทึกภาพ ตรวจวัดผลการทดลอง

$$\text{\% การปนเปื้อนเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่เกิดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3.9.2 การทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

3.9.2.1 ทดสอบการงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed germination) โดยวิธี Bp method (Between paper) ตามหลักของ Standard germination test (ISTA, 1995) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์มาจำนวน 400 เมล็ด เพาะบนกระดาษเพาะที่ชื้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ทำการนับจำนวนต้นกล้าที่ปรกติ แสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์การงอก

3.9.2.2 ทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed vigor) โดยวิธี Sand test ตามหลักของ Standard germination test (ISTA, 1995) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์มาจำนวน 400 เมล็ด เพาะทดสอบในกระบะทรายชื้น ในสภาพสิ่งแวดล้อมปกติ นาน 5-7 วัน ทำการนับจำนวนต้นกล้า ที่มีลักษณะแข็งแรง แสดงผลในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์ต้นแข็งแรง

3.9.2.3 ทำการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ TZ (Tetra Zolium) ตามหลักของ Standard germination test (ISTA, 1995) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์มาจำนวน 400 เมล็ด แช่น้ำจนเมล็ดข้าวโพดดูดน้ำเข้าไปในเมล็ดจนมีความอวบน้ำ ทำการผ่ากลางเมล็ดด้วยมีดให้ผ่านกลางของ Embryo ใช้ตัวอย่างเมล็ดละซีก แล้วแช่ในสารละลาย Tetra Zolium เข้มข้น 0.1% เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วแยกเมล็ดออก ซับให้แห้ง ทำการตรวจนับส่วนที่มีการติดสีแดงซึ่งเป็นส่วนที่มีชีวิต แสดงผลในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต

3.9.2.4 การวัดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ การอบด้วยความร้อน (Hot air – Oven method) เป็นวิธีการทดสอบความชื้นของเมล็ดมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไป หลักการในการทดสอบในวิธีนี้ก็โดยการไล่ความชื้นที่มีอยู่ในเมล็ดออก โดยการให้ความร้อนในสถานที่ควบคุมได้ และวัดปริมาณความชื้นที่สูญหายไป โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเดิม ซึ่งวิธีการทดสอบความชื้นโดยวิธีนี้กำหนดไว้อย่างละเอียดในกฎสากลการทดสอบเมล็ดพันธุ์ (ISTA Rules)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก %

$$\text{ความชื้นฐานแห้ง \% MC. dry basis} = \frac{\text{(น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ - น้ำหนักเมล็ดหลังอบ) x 100}}{\text{น้ำหนักแห้งเมล็ด}}$$

3.9.3 การทดสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี

3.9.3.1 กิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส Succinate dehydrogenase ("succinate INT") enzymatic activity (mitochondrial enzyme marker) ทดสอบโดยการวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase Activity) ตามวิธีของ Karl Hostetler lab, UCSD, 1980s.

วิธีการทดสอบ

1. บดเมล็ดในอัตรา 10 กรัมต่อสารละลาย Tris buffer 30 ml.

2.เตรียมสารละลาย: 200, มิลลิลิตร, สิ่งที่เตรียม 0.1 M K phosphate, pH 7.4 (200 ml of 0.1M Potassium phosphate pH 7.4 = 1.41 g K_2HPO_4 + 0.259 g KH_2PO_4) 0.1 M succinate (200 ml of 0.1M succinate = 3.24 g) 0.05 M sucrose (200 ml of 0.05 M sucrose = 3.42 g)
ในการเตรียมสารละลายนี้ เติม INT Formosan (ในที่ๆอุณหภูมิต่ำ) แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 2 mg/ml. เขย่า 20 นาที เตรียมตัวอย่างใหม่ทุกครั้ง. INT Formosan: p-Iodonitrotetrazolium violet (Sigma).

3. ผสม [stock/INT mix] ปริมาณ 200 µl กับสารผสมของ [protein (i.e., sample for assay) + H_20 (containing ~20-50 µg mitochondria)]. ปริมาณ 200 µl

4. ปรับอุณหภูมิเป็น 37 ºC ใน "phosphorus" assay tubes นาน 20 นาที

5. หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA.10% ปริมาณ 400 µl

6. เติมethyl acetate กับvortex อย่างละ 1.5 ml.

7. ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

8. อ่านค่าดูดกลืนแสงโดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วย cuvettes ขนาด 0.6 มิลลิลิตร อ่านค่าที่เส้นสีชมพูบนสุด Delta OD/nm = 0.0134 OD/nm INT reduced.

9. บันทึกผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนในอาหารคำนวณได้จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งจะเป็นพวกสารประกอบโปรตีน (True protein) และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen) ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์นี้จึงเป็นโปรตีนรวมหรือโปรตีนหยาบ (crude protein) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ตามวิธีของ Kjedahl and Soxhlet Method โดยวิธีการมี 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การย่อย (Digestion) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนสารประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารให้อยู่ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้กรดกำมะถันเข้มข้น (H_2SO_4)

2. การกลั่น (Distillation) เป็นขั้นตอนของการกลั่นเพื่อไล่แอมโมเนียออกมาโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และเก็บไว้ในสารละลายกรดมาตรฐาน (boric acid)

3. การไตเตรต (Titration) ในกรณีที่ใช้ boric acid เป็นตัวเก็บแอมโมเนีย ให้ไตเตรตด้วยสารละลายกรดมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารละลายกรดมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนีย

4.คำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้โดยใช้ค่า Factor 6.25 (AOAC 960.25, 1995)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Micro Kjeldahl method

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.2 ชุดเครื่องย่อย (Gerhardt Kjeldatherm Digestion Unit; KB)

1.3 ชุดเครื่องกลั่น (Gerhardt Vapodest ; VAP 30)

1.4 ตู้ดูดสารเคมี

2. สารเคมี

2.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. sulfuric: H2SO4)

2.2 สารละลายกรดซัลฟูริก 0.1 N

2.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.5 สารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2.6 สารเร่งปฏิกิริยา (Catalyst; CuSO4:K2SO4 1:10)

2.7 สารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิด (Indicating boric acid)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลายอินดิเคติงบอริกแอซิด

1. ชั่ง Methyl red 200 mg. ละลายใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 100 ml.

2. ชั่ง Methylene blue 100 mg. ละลายใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ 50 ml.

3. ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน นำมิกซ์อินดิเคเตอร์ 10 ml.แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 ml.

วิธีวิเคราะห์

1. บดเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องบด แล้วชั่งน้ำหนักบนกระดาษชั่งสาร 1.5000 กรัมใส่ใน Kjeldahl tube

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 10 g. และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 ml.

3. นำไปย่อยด้วยเครื่อง Kjeldahltherm ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อย 400 °C จนตัวอย่างเป็นสีเขียวใส

4. ทิ้งให้ Kjeldahl tube เย็น

5. ต่อ Kjeldahl tube เข้ากับเครื่องกลั่น เติมน้ำกลั่นลงไป 40 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนที่เกิดขึ้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 32 ลงไป 50 มิลลิลิตรหรือจนตัวอย่างกลายเป็นสีดำ

6. รองรับสารที่กลั่นด้วยสารละลายกรดบอริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด สารละลายที่ได้จะมีสีม่วงอ่อน

7. กลั่นตัวอย่างประมาณ 4 นาทีหรือจนไอของ NH_3 ถูกกลั่นจนหมด

8.หยุดกลั่น จากนั้นนำสารละลายในขวดรองรับที่เปลี่ยนจากสีม่วงอ่อนกลายเป็นสีเขียวอ่อนมา ไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีเขียวอ่อนเป็นสีม่วงอ่อน

9. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีน

ปริมาณไนโตรเจน

$$\text{N (\%)} = \frac{\text{ปริมาตรกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรท (มล.) x ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก x 1.4}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

ปริมาณโปรตีนในข้าวโพด

Protein (%) = ปริมาณ N (%) x 6.25

6.25 คือค่า Factor ที่ใช้ในการเทียบปริมาณโปรตีนจากไนโตรเจนที่ได้ (AOAC, 1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved