บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสิ่งทดลอง

นำเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พันธุ์สุวรรณ 1 ที่ได้ปลูกจากแปลงทดลองในอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีคุณภาพดี สะอาด ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและโรค

1. การปลูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* ลงบนตัวอย่างข้าวโพด

แยกเชื้อราจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่คาดว่ามีการติดเชื้อ โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาเพาะลงบนกระดาษชื้น (Blotter method) (ISTA, 2006) ทิ้งไว้ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อพบเชื้อราที่ต้องการแล้วจากนั้น ทำเชื้อราให้เป็นเชื้อราที่บริสุทธิ์ (pure culture) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเชื้อรามีอายุ 7 วัน นำเชื้อราที่ได้มาเตรียม spore suspension และวัดความเข้มข้นของ spore ในสารละลาย โดยใช้ heamacytometer จากนั้นนำเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มาปลูกเชื้อที่เตรียมได้ และทิ้งไว้ 7 วัน

2. การปรับระดับความชื้นของตัวอย่างข้าวโพด

เริ่มจาก วัดความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ด้วยวิธี hot air oven นำมาคำนวณ ปริมาณน้ำที่ต้องใช้ในการเพิ่มความชื้น จากสูตร

$$W_1 (100 - M_1) = W_2 (100 - M_2)$$

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักของเมล็ดที่เราใช้ (กิโลกรัม)

M_1 คือ ความชื้นของเมล็ดที่วัดจากตัวอย่างใน ข้อ 1

W_2 คือ น้ำหนักของเมล็ดที่ได้ ในความชื้นระดับที่ต้องการ ใช้ (กิโลกรัม)

M_2 คือ ความชื้นที่ต้องการปรับ

จากนั้นจะได้ปริมาณน้ำ ที่ต้องการในการปรับระดับความชื้น ใช้ปริมาณน้ำตามจำนวนที่คำนวณไว้ บรรจุลงใน กระบอกฉีดที่เตรียมไว้ พรมน้ำที่เตรียมไว้ให้ทั่วถึง ตามจำนวนที่กำหนด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเข้า เครื่อง shaker ทิ้งไว้ ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้น เขย่าทุกๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง นำเมล็ดออกจากเครื่อง shaker ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นทำการวัดความชื้น เพื่อบันทึกค่าความชื้น

การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

นำเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 1 ปลูกในอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีคุณภาพดีและมีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสมไม่มีการเข้าทำลายของแมลง ทำการปลูกถ่ายเชื้อรา *A. flavus* ด้วยวิธีการใช้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ปรับระดับความชื้นของเมล็ดให้อยู่ที่ระดับ 15% ทำการทดลองโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่วิทยุที่ได้สร้างและปรับปรุงจาก Institute of Agricultural Engineering, University of Göttingen Germany ที่มีคลื่นความถี่ เฉพาะ 27.12 MHz. โดยให้คลื่นความถี่วิทยุแก่เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับอุณหภูมิ 80, 85 และ 90°C และ ระยะเวลาที่ใช้ คือ 1 และ 3 นาที ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Complete randomized design (CRD)

การตรวจสอบคุณภาพข้าวโพด

1. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ติดมากับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ทำการสุ่มเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในแต่ละกรรมวิธี ตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อรา *Aspergillus flavus*ที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA method) และวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (ISTA, 2006) โดยคำนวณจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ดังสูตร

$$\% \text{ การติดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

2. การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

2.1 ความชื้นของเมล็ด

วิธีอบด้วยความร้อนมาตรฐาน (ISTA, 2006)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์การวิเคราะห์</u>

1) ตู้อบลมร้อน (hot air oven; UM500 Memmert, Germany)

2) เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AB204-S; Mettler-Toledo (Thailand) Ltd., Thailand)

3) เครื่องบดตัวอย่าง (sample mill; Cemotec Foss Tecator, Germany)

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น</u>

1) บดเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องบด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) นำกระป๋องอะลูมิเนียมและฝาไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3) ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักจนมีค่าแน่นอน

4) ชั่งตัวอย่างข้าวที่บดละเอียด น้ำหนัก 5 กรัม จดน้ำหนักที่แน่นอน ปิดฝาอบแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส พร้อมฝาในตู้อบ 4 ชั่วโมง

5) เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการปิดฝาแล้วนำมาทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝา

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{(น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ) x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

2.2 แผลและรอยแตกร้าวของเมล็ด

นำข้าวโพดที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุมาสุ่มตัวอย่าง เพื่อตรวจการแตกร้าวของเมล็ดด้วยตาเปล่า โดยสุ่มตัวอย่างของเมล็ด 100 เมล็ด จากนั้นนำมาส่องภายใต้ แว่นขยายเพื่อดูรอยแตกร้าวของเมล็ด และคำนวณเปอร์เซ็นต์ ดังสูตร

$$\% \text{ การแตกร้าว} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่แตกร้าว}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

3. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

3.1 เปอร์เซ็นต์อะมิโลส (amylose)

โดยวิธีกาวัดค่าการดูดกลืนแสงสารละลายสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไอโอดีน (iodine-blue colorimeter) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Juliano, 1971) ดังนี้

วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1. บดเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องบด ให้แป้งร่อนด้วยตระแกรงร่อน 100 mesh ชั่งตัวอย่างแป้งที่ได้มา 100 ± 0.1 mg ใส่ในขวด volumetric flask 100 ml. ที่แห้งสนิท

2. เติม ethyl alcohol 1 ml. เขย่าเบาๆ

3. เติม 1 N NaOH 9 ml เขย่าเบาๆ

4. ปั่นกวนตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นระบบแม่เหล็ก นาน 10 นาที ให้เป็นน้ำแป้ง ปรับปริมาตรสารด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ 100 ml ผสมให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. เตรียม volumetric flask 100 ml. ชุดใหม่ เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 ml. กรดเกลเชียลอะซิติก 2 ml. และ สารละลาย I_2 2 ml.

6. ดูดสารละลายจากข้อ 4 มา 2.5 ml. ใส่ลงในขวดแก้วที่เตรียมไว้ในข้อ 5 เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 ml. แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

7. ทำ blank โดยเตรียม volumetric flask 100 ml. เติม กรดเกลเชียลอะซิติก 2 ml. และสารละลาย I_2 2 ml. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml. ด้วยน้ำกลั่น เขย่าเบ่าๆ

8. วัดความเข้นข้นของสีสารละลายด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm. หลังจากปรับเครื่องด้วย blank ให้ได้ค่า absorbance เท่ากับ 0

9. นำ absorbance ไปหาปริมาณเปอร์เซ็นต์อะมิโลส (amylose) โดยเทียบกับกราฟมาตราฐานที่เตรียมไว้

การทำกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง อะมิโลส 0.0400 กรัม ใส่ในขวด volumetric flask 100 ml. ที่แห้งสนิทแล้วดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างเป็นสาระลายมาตรฐาน

2. เตรียม volumetric flask 100 ml. จำนวน 5 ขวด เติมน้ำกลั่นขวดละ 70 ml. เติมกรดเกลเชียลอะซิติก ปริมาตร 0.4 ml. ในขวดที่ 1 ปริมาตร 0.8 ml. ในขวดที่ 2 ปริมาตร 1.2 ml. ในขวดที่ 3 ปริมาตร 1.6 ml. ในขวดที่ 4 และปริมาตร 2.0 ml. ในขวดที่ 5 ตามลำดับ แล้วเติม สารละลาย I_2 2 ml. ลงในแต่ละขวด

3. ดูดสารละลายมาตรฐานตามข้อ 1 ปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 ml. ซึ่งเทียบเท่าปริมาณอะมิโลสร้อยละ 8, 16, 24, 32 และ 40 ตามลำดับ ใส่ในขวดที่เตรียมไว้ในข้อ 2 เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml. แล้ววัดค่า absorbance ที่ ความยาวคลื่น 620 nm. หลังจากปรับเครื่องด้วย blank เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์อะมิโลส (amylose) ในข้อ 7

4. นำ absorbance กับปริมาณอะมิโลสในสารละลายมาตรฐาน มาเขียนเป็นเส้นกราฟมาตรฐาน

5. นำกราฟมาตรฐานที่ได้จากข้อ 4 มาใช้แปลงค่า absorbance ให้เป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์อะมิโลส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 โปรตีน (protein) โดยตามวิธีของ Kjeldahl method (AOAC, 2005)

วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด ที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวโพด ด้วยวิธี Kjedalh (AOAC, 2005) โดยดูจากปริมาณไนโตรเจนซึ่งคำนวณได้จากสูตร %N ปริมาณโปรตีนที่ได้จะคำนวณจาก %N คูณด้วย 6.25 ดังสูตร

$$\%N = \frac{(\text{ml. } H_2SO_4 \text{ for sample} - \text{ml. } H_2SO_4 \text{ for blank}) \times \text{standard } H_2SO_4 \times 0.014 \times 100}{\text{Wt. of sample (g)}}$$

$$\text{Protein (\%)} = \%\ N \times 6.25$$

3.3 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ aflatoxin นำเมล็ดข้าวโพด ที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซิน ด้วยวิธี AFLATEST AOAC FLUOROMETER PROCUDURE FOR CORN, RAW PEANUTS AND PEANUT BUTTER โดยวัดการเรืองแสงของตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Fluorometer ค่าที่ได้จะเป็นปริมาณความเข้มข้นของสาร aflatoxin โดยแสดงหน่วยเป็น part per billion(ppb) (Anonymous, 1997) (In house method base on Vicam, Fluorometer รุ่น FM 109510-33, Barnstead international, UK)

4. การตรวจสอบคุณภาพข้าวโพดอาหารสัตว์โดยเน้นที่คุณภาพของแป้ง

4.1 ลักษณะของเม็ดแป้ง เตรียมแป้ง โดยการบดเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการให้คลื่นความถี่วิทยุ จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรง 100 mesh เมื่อได้แป้งแล้วชั่งแป้งตัวอย่าง 0.0006 กรัม การหยดสารละลายน้ำตาลซูโครส (ความเข้มข้น 80%) 40 ไมโครลิตร บนสไลด์ที่เตรียม แล้วนำไปส่งใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาเพื่อดูรูปร่างขนาดเม็ดแป้งและดูการกระจายของทำเช่นการตรวจรูปร่างของเม็ดแป้งแต่เพิ่มสารละลายไอโอดีน 40 ไมโครลิตร ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์และอาศัย heamacytometer บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ (Sahai and Jackson, 1996)

4.2 ความคงตัวของแป้งสุก (Gel consistency) โดยใช้วิธีการของ Champagen *et al.* (1973) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. บดเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องบด ให้แป้งร่อนด้วยตระแกรงร่อน 100 mesh ชั่งแป้งตัวอย่าง 0.1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13×10 มิลลิเมตร

2. เติมสารละลายไธมอลบูล (thymol blue) ความเข้มข้ม ร้อยละ 0.025 จำนวน 0.2 มิลลิเมตร ลงในหลอดแป้ง ที่เตรียมไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เติมโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล จำนวน 2 มิลลิเมตร เขย่าด้วย mixer เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อปล่อยให้แป้งลอยตัว

4. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นนำหลอดมาเขย่าด้วย mixer อีกครั้งเป็นเวลา 2-3 นาที

5. นำไปแช่ในน้ำเย็นจัด 20 นาที วางหลอดทดลองในแนวนอนบนกระดาษกราฟเป็นเวลา 30 นาที อ่านระยะที่แป้งไหล โดยเทียบกับกระดาษกราฟ

4.3 ความหนืดของแป้ง

โดยใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) รุ่น RVA-4D จากบริษัท Newport Scientific, Warriewood, NSW, Australia. มีขั้นตอนดังนี้

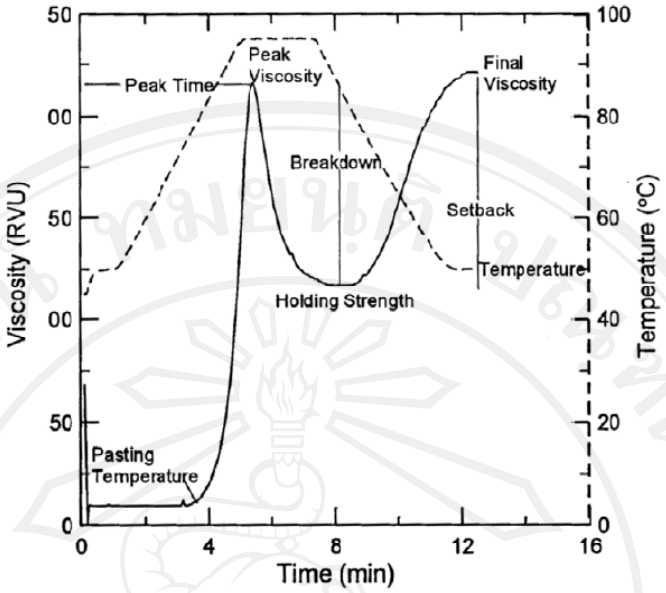
1. เตรียมบดเมล็ดข้าวโพดด้วยเครื่องบด ให้แป้งร่อนด้วยตระแกรงร่อน 100 mesh ชั่งจำนวน 3 กรัม ใส่ในกระป๋องจำเพาะสำหรับเครื่อง RVA

2. เทน้ำกลั่น 25 ml. ลงในกระป๋องแล้วใช้ใบกวนที่เข้าชุดกันกับกระป๋อง กวนตัวอย่างเพื่อไม่ให้จับเป็นก้อนที่ผิวหรือติดกับใบกวน

3. นำกระป๋องที่ใส่ใบกวนเข้าเครื่อง RVA และกดมอเตอร์ลงเพื่อให้เครื่องทำงาน เครื่องจะทำงานโดยอัตโนมัติ โดยความเร็วรอบของของใบกวนในช่วง 10 วินาที แรกเท่ากับ 960 rpm และลดระดับความเร็วรอบลงเป็น 160 rpm จนกระทั่งเครื่องทำงานเสร็จ ส่วนอุณหภูมิของเครื่อง RVA จะมีการเปลี่ยนแปลง ตามขั้นตอนดังนี้

- อุณหภูมิเริ่มต้น 50 °C เป็นเวลา 1 นาที
- อุณหภูมิ ต่อมา 95 °C ในนาที ที่ 4.7 และจะคงที่เป็นเวลา 2 นาที
- อุณหภูมิสุดท้าย ลดลงเป็น 50 °C ในนาทีที่ 11 และจะคงที่ตลอดจนเวลาครบ 12.5 นาที ซึ่งสิ้นสุดการทำงานของเครื่องโดยเครื่องจะหยุดอย่างอัตโนมัติ และซึ่งค่าที่ได้จะแสดงผลออกมาในรูปแบบกราฟซึ่งจะมี 5 ค่าที่สามารถอธิบายได้ คือ Pasting temperature, Peak viscosity, Final viscosity, Breakdown, Setback from trough ดังภาพที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 กราฟจากการวิเคราะห์ความหนืดของแป้งด้วยเครื่อง RVA (Newport Scientific Pty, Ltd., 1998)

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved