

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การปรับสภาพหัวเชื้อเห็ดขอนขาวให้เหมาะสมต่อเปลือกข้าวโพดฝักอ่อน

3.1.1 หัวเชื้อเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* Mont LS-YA

หัวเชื้อเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ได้รับจาก ผศ.ดร.ชรีดา ปุกहुต ผู้เชี่ยวชาญด้านเห็ด จากภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยหัวเชื้อเห็ดขอนขาวสายพันธุ์ดังกล่าวจะถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Malt extract (YM) Agar ที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) Malt extract 0.5, Yeast extract 0.1 และ Agar 1.5 และผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำเห็ดขอนขาวที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar ผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งขนาด 0.5 mesh ปริมาณ 1% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar ผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งบดใหม่ทุก ๆ 7 วัน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 การเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในอาหารแข็งผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งบด

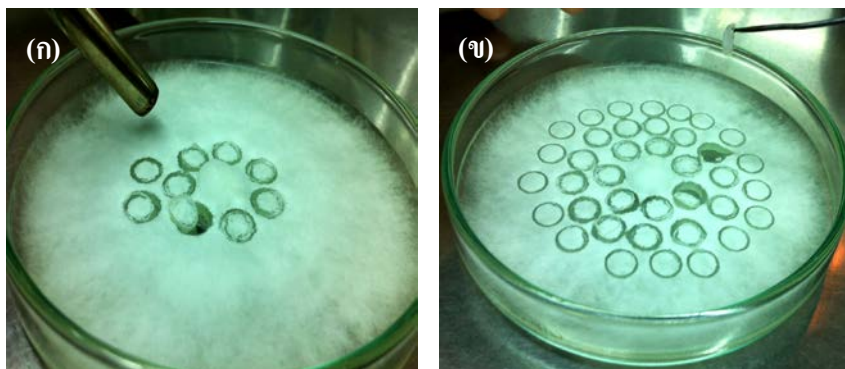
นำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งขนาด 0.5 mesh (หรือ 7.4 มิลลิเมตร) เติมลงในอาหาร YM agar ในปริมาณ 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5% ก่อนนำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว) จากนั้นจึงทำการถ่ายเส้นใยของเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar ผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งบด (ข้อ 3.1.1) ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ cork borer (ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70% แล้วลนไฟ) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเส้นใยเห็ดขอนขาวแล้ววางตรงบริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ ทำการติดตามการเจริญของเส้นใยเห็ดขอนขาวที่ 0 1 2 3 และ 4 วัน ด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง

3.3 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในอาหารเหลวในระดับฟลาस्क

3.3.1 การเตรียมเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (Starter)

ทำการถ่ายเส้นใยของเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar ผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งบด ที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้ cork borer (ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70% แล้วลนไฟ) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดตัดเส้นใยเห็ดขอนขาวโดยวางตรงบริเวณกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนที่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1) จากนั้นจึงใช้ cork borer (ฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์ 70% แล้วลนไฟ) ขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ดังกล่าวตัดเส้นใยเห็ดขอนขาวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ภาพที่ 3.1 แสดงให้เห็นลักษณะของเส้นใยเห็ดขอนขาวที่ผ่านการตัดด้วย cork borer เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ



ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะของเส้นใยเห็ดขอนขาวที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar ผสมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้ง บดเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ และถูกตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ: (ก) ช่วงการตัดเส้นใย; (ข) แผ่นเส้นใยเห็ดขอนขาว ที่ใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2 สภาพการเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในระดับฟลาสก์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวอาศัย Basal medium ตามการศึกษาของ Gbolagade et al. (2006) ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) KH_2PO_4 0.05, MgSO_4 0.05, FeSO_4 0.01, KNO_3 1.55 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนแห้งบดขนาด 0.5 mesh ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญในการเลี้ยงในสภาพอาหารแข็ง (ข้อ 3.2) นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะถ่ายหัวเชื้อเห็ดขอนขาวที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 20 ชิ้น ต่อฟลาสก์ นำไปเลี้ยงใน 3 สภาพ ประกอบด้วย สภาพวางนิ่ง (Static cultivation) สภาพการเลี้ยงด้วยการเขย่าแบบ Reciprocal (Reciprocal shaking cultivation) ที่ 30 60 และ 90 รอบของการเขย่า (stroke) ต่อ นาที และสภาพการเลี้ยงด้วยการเขย่าแบบ Rotary (Rotary shaking cultivation) ที่ 75 100 และ 125 รอบต่อ นาที ทำการทดลองสามซ้ำและติดตามปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ตามวิธีของ Sakurai et al. (1977) เมื่อทำการเลี้ยงเห็ดขอนขาวเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ ทั้งนี้เพื่อสรุปหาสภาพการเลี้ยงที่เห็ดขอนขาวที่เหมาะสมในสภาพฟลาสก์

3.3.3 อัตราส่วนของเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเห็ดขอนขาว

L. squarrosulus Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในระดับฟลาสก์

ทำการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในฟลาสก์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 โดยทำการเติมเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งสามระดับ คือ 2.5 5 และ 7.5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อเห็ดขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 20 ช้อน ต่อฟลาสก์ ทำการเลี้ยงในสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 ทำการติดตามปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ตามวิธีของ Sakurai et al. (1977) เมื่อทำการเลี้ยงเห็ดขอนขาวเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ

3.3.4 การปรับสภาพเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเห็ดขอนขาว

L. squarrosulus Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในระดับฟลาสก์

ทำการปรับสภาพเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งใน 4 สภาพ ประกอบด้วย

3.3.4.1 การปรับสภาพด้วยด่างเจือจาง

โดยนำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งขนาด 0.5 mesh แห้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 % อัตราส่วน 10% w/v วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง (คุณธิ ธนะบริวัฒน์ และคณะ, 2549) 1 และ 1.5 ชั่วโมง (ปิยะมาส สิริแสงสว่าง, 2543) จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH เท่ากับ 7 แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วจึงนำไปไว้ในโถดูดความชื้นต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำออกมาเก็บในขวดป้องกันความชื้นเพื่อใช้ในการศึกษา

3.3.4.2 การปรับสภาพด้วยกรดอะซิติก

โดยนำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งขนาด 0.5 mesh แห้งในกรดอะซิติก 10 % (จากน้ำส้มสายชูหมักธรรมชาติ) อัตราส่วน 10% w/v ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ เป็นเวลา 0.5 และ 1 1.5 และ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH เท่ากับ 7 แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วให้จึงนำไปไว้ในโถดูดความชื้นต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเก็บในขวดป้องกันความชื้นเพื่อใช้ในการศึกษา

3.3.4.3 การปรับสภาพด้วยความร้อน

โดยนำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งขนาด 0.5 mesh ปริมาณ 5 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผ่านการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °ซ ระยะเวลา 30 45 นาที (Zia-ur-Rehman et al., 2000) และ 60 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้ากรอง แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วให้จึงนำไปไว้ในโถดูดความชื้นต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเก็บในขวดป้องกันความชื้นเพื่อใช้ในการศึกษา

3.3.4.4 การปรับสภาพโดยไมโครเวฟ

โดยนำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งขนาด 0.5 mesh ปริมาณ 7.5 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร มาผ่านการให้ความร้อนจากไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ เป็นเวลา 25 35 และ 45 นาที (Ma et

al., 2009) หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยผ้ากรอง แล้วจึงนำไปอบแห้งที่ 80 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างแห้งดีแล้วให้จึงนำไปไว้ในโถดูดความชื้นต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาเก็บในขวดป้องกันความชื้นเพื่อใช้ในการศึกษา

จากนั้นนำเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 3.3.4.1 – 3.3.4.4 มาใช้ในการเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในพลาสติกเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2 โดยใช้เปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 ทำการถ่ายหัวเชื้อเห็ดขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 20 ชิ้น ต่อพลาสติก ทำการเลี้ยงในสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 ติดตามการเจริญของเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont. LS-YA โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ตามวิธีของ Sakurai et al. (1977) ภายหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และทำการติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสตาม และเซลลูเลสที่ระบุไว้ใน Pukahuta et al. (2004)

3.3.5 สารอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไซลิเนสและเซลลูเลสของเห็ดขอนขาว

L. squarrosulus Mont LS-YA ที่เลี้ยงในสภาพอาหารเหลวในระดับพลาสติก

3.3.5.1 ปริมาณน้ำตาลเด็กซ์โตสที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณเด็กซ์โตสที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.3.2 โดยใช้ปริมาณเปลือกข้าวโพดฝักอ่อนบดแห้งที่ผ่านการปรับสภาพที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 ปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3 จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อเห็ดขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 จำนวน 20 ชิ้น ต่อพลาสติก ทำการเลี้ยงในสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 ติดตามปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ตามวิธีของ Sakurai et al. (1977) และกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสที่ระบุไว้ใน Pukahuta et al. (2004) เมื่อทำการเลี้ยงเห็ดขอนขาวเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ

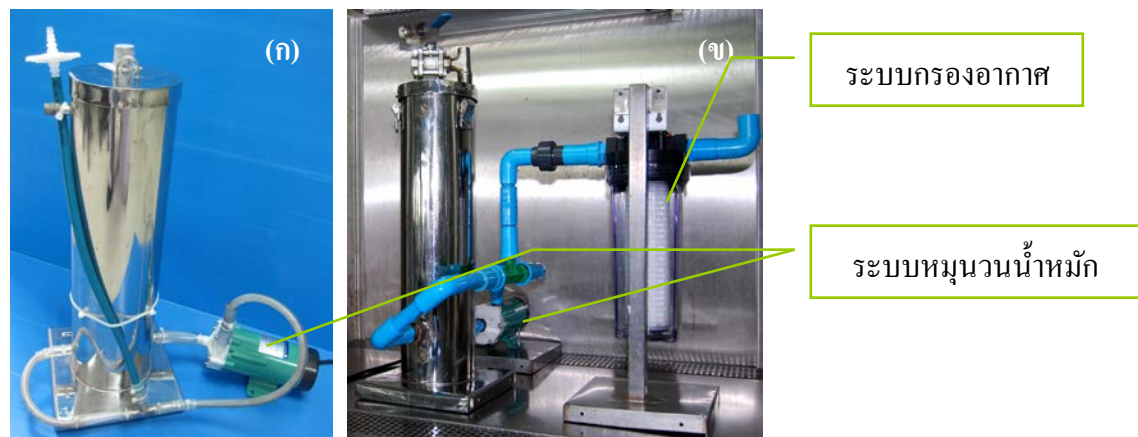
3.3.5.2 ปริมาณ Diammonium hydrogen phosphate (DAP) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณ DAP ที่ปริมาณ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 % (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ปริมาณเด็กซ์โตสที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 และสภาพการเลี้ยงต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 3.3.5.2 จากนั้นติดตามปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ตามวิธีของ Sakurai et al. (1977) และกิจกรรมของเอนไซม์ไซลานเนสและเซลลูเลสตามวิธีที่ระบุไว้ใน Pukahuta et al. (2004) เมื่อทำการเลี้ยงเห็ดขอนขาวเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 °ซ

3.4 การเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในอาหารเหลวในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศขนาด 10 ลิตร

3.4.1 การปรับปรุงถังหมักระบบผสมอากาศเข้ากับน้ำหมักขนาด 10 ลิตร

ถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศได้รับการออกแบบเพื่อใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (วราวุฒิ ครุสง และคณะ, 2553) โดยถังต้นแบบก่อนการปรับปรุงแสดงในภาพที่ 3.2 (ก) ซึ่งมีระบบกรองอากาศที่ใช้แผ่นกรอง ในขณะที่ถังหมักที่ปรับปรุงดังแสดงในภาพที่ 3.2 (ข) ได้เปลี่ยนระบบกรองอากาศและระบบท่อ PVC เชื่อมโยงกับระบบการให้อากาศ อย่างไรก็ตามระบบนี้ไม่สามารถเปลี่ยนระบบปั๊มได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องขนาดของถังไม่เหมาะสมกับระบบปั๊มของถังหมักระดับใหญ่จึงทำให้สามารถทำการศึกษาที่ระดับการให้อากาศที่ระดับเดียวเท่านั้น



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะของถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศขนาด 10 ลิตร: (ก) ถังหมักต้นแบบก่อนการปรับปรุง; (ข) ถังหมักต้นแบบภายหลังการปรับปรุง

3.4.2 การเลี้ยงเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศขนาด 10 ลิตร

ทำการศึกษาลักษณะการเห็ดขอนขาว *L. squarrosulus* Mont LS-YA ในสภาพอาหารเหลวในถังหมักระบบผสมน้ำหมักเข้ากับอากาศขนาด 10 ลิตร โดยใช้สภาพการเลี้ยงต่างๆ เช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 3.3.5.2

3.5 การวางแผนการทดลอง

ทำการวางแผนการทดลองในแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองจะนำมาวิเคราะห์หา ANOVA และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Turkey's Test ที่ระดับ $p \leq 0.05$