บทที่ 2 วัสดุและวิธีการ

2.1 แหล่งของซิลิคอน แคลเซียมและซิลิคอน-แคลเซียม

ภูไมท์ (Pumice) เป็นแหล่งของซิลิคอนที่ใช้ในทางเกษตรกรรมและผลิตในประเทศไทย ภูไมท์เป็นหินภูเขาไฟที่มีซิลิคอนในปริมาณสูงมีลักษณะเป็นผงสีเทาอ่อน ภูไมท์ประกอบด้วย 68.7% silicon 13.6% Aluminum oxide (Al_2O_3), 2.18% Sodium oxide (Na_2O), 0.46% Magnesium oxide (MgO), 4.69% Potassium oxide (K_2O) และ 1.02% Calcium oxide (CaO)

ยิปซั่มหรือ Gypsum ($CaSO_4$) จะถูกใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมในการทดลอง ยิบซั่มที่ใช้เป็นยิบซั่มที่ผลิตในประเทศไทยที่ใช้ในงานเกษตรกรรม มีความบริสุทธ์ 97% ประกอบไปด้วย 23.3% calcium และ 17.8% sulfur (SO_4)

ภูไมท์ซัลเฟต (Pumice sulfate) จะถูกใช้เป็นแหล่งของซิลิคอน-แคลเซียมในการทดลอง ภูไมท์ซัลเฟตที่ใช้ผลิตในประเทศไทยและใช้ในงานเกษตรกรรม ประกอบด้วย 50.0% pumice, 7.0% sulfate, 12.0% calcium, 0.20% phosphoric acid (H_3PO_4), 0.01% magnesium, 0.01% iron และ 0.0005% zinc.

ส่วนสารเคมีอื่นๆที่ใช้ในการทดลองเป็น analytical grade

2.2 การเตรียมวัสดุเพาะและการผลิตเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*)

เชื้อเห็ดภูฏานดำ เป็นเห็ดในตระกูลเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*) ซึ่งมีดอกสีเทาเข้มกว่าเห็ดนางฟ้าชนิดอื่น เชื้อเห็ดภูฏานเบอร์ 3 บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองอยู่ในรูปเส้นใยในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) ได้มาจากกลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นำแม่เชื้อที่ได้มาต่อเชื้อในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) หลังจากบ่มเส้นใยที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์หรือเมื่อเส้นใยสีขาวเจริญเต็มหน้าวุ้นใน Petri dishes จึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1cm^2 ใส่ลงในขวดบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15min เพื่อทำเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มเชื้อขยายในเมล็ดข้างฟ่างที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จึงนำมาเพาะไว้บนวัสดุเพาะเลี้ยงก้อนเชื้อใหม่

สูตรวัสดุเพาะมาตรฐานสำหรับเห็ดนางฟ้าประกอบด้วย

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง 60%

รำละเอียด 6%

ดีเกลือหรือ $MgSO_4$ (industrial grade) 0.12%

ปูนขาวหรือ $CaCO_3$ (industrial grade) 0.6%

ผสมน้ำให้มีความชื้น 60%

สูตรวัสดุเพาะต่างๆที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยสูตรวัสดุเพาะมาตรฐานที่มีการเติมยิบซั่มความเข้มข้น 5 และ 10% หรือภูไมท์ 10, 20, 30% หรือภูไมท์ซัลเฟต 10, 20 และ 30% ปริมาณยิบซั่ม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟต คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง ***Table 2.1*** แสดงสูตรต่างๆของวัสดุเพาะ

บรรจุวัสดุเพาะที่คลุกผสมเข้ากันดีแล้วลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 25x35cm น้ำหนักของวัสดุเพาะในแต่ละถุงเป็น 0.9kg กดให้แน่นตึงสูงประมาณ 2/3 ของถุง รวบปากถุงบีบอากาศออกสวมคอพลาสติกแล้วพับปากถุงพาดลงมา อุดด้วยสำลี หุ้มทับด้วยกระดาษแล้วรัดยางให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในถังนึ่งอุณหภูมิ 90-100°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2h ทิ้งไว้ให้ถุงเย็น นำถุงวัสดุออกมาใส่เชื้อจากหัวเชื้อเห็ดที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างถุงละประมาณ 10-15 เมล็ด (โดยเขย่าเมล็ดข้างฟ่างให้กระจายออก) โดยปิดและเปิดจุกสำลีโดยเร็ว โดยปฏิบัติในที่สะอาดมิดชิดไม่มีลมโกรก นำถุงวัสดุเพาะที่ใส่เชื้อแล้ววางในห้องบ่มเส้นใยที่ควบคุมอุณหภูมิ 24-28°C เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 อาทิตย์จนเส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อ จึงนำเข้าเปิดดอกในโรงเรือน เปิดดอก เมื่อเส้นใยเริ่มรวมตัวกันจึงถอดสำลีและคอขวดออก รักษาความชื้นที่ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-90% อุณหภูมิ 25-32°C ในโรงเรือนเปิดดอก การเก็บเกี่ยวผลผลิตทำเมื่อดอกบานเต็มที่แต่ขอบหมวกยังไม่บานย้วย ในแต่ละสูตรใช้ก้อนเชื้ออย่างน้อย 25 ก้อนการปฏิบัติต่อก้อนเชื้อทุกก้อนและทุกสูตรเหมือนกันหมดและเปิดดอกในโรงเรือนเดียวกัน การคำนวณ Biological efficiency (BE) คำนวณโดย

$$BE\ \% = \frac{\text{Weight of fresh mushroom harvested} \times 100}{\text{Weight of dry substrate used}} \qquad (2.1)$$

2.3 การวัดปริมาณซิลิคอนในดอกเห็ด

ดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวจากวัสดุเพาะแต่ละสูตร (อย่างน้อยสูตรละ 1kg) ถูกแยกเป็นครีบดอกและก้านดอก อบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12h นำครีบและก้านที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 20 mesh นำตัวอย่างครีบและก้านบดมา wet-digested โดยใช้ HNO_3-H_2O_2-distilled water ในอัตราส่วน 4:2:4 ในปริมาณ 10ml วัดปริมาณซิลิคอนด้วยวิธี colorimetric ตามวิธีของ Samadi-Maybodi and Atashbozorg (2006) การวัด

Table 2.1 Summary of substrate formulations

Treatment code	**C**	**G5**	**G10**	**PS10**	**PS20**	**PS30**	**P10**	**P20**	**P30**
Basic Ingredients	sawdust (60 kg) + rice bran (6 kg) + MgSO4 (0.12 kg) + CaCO3 (0.6 kg) + water to 60% moisture content								
Gypsum	-	3 kg (5%)	6 kg (10%)	-	-	-	-	-	-
Pumice sulfate	-	-	-	6 kg (10%)	12 kg (20%)	18 kg (30%)	-	-	-
Pumice	-	-	-	-	-	-	6 kg (10%)	12 kg (20%)	18 kg (30%)

(C = control, G = gypsum, PS = pumice sulfate, P = pumice)

ปริมาณซิลิคอนทำโดยการเตรียมสารละลาย heteropoly blue compound โดยการทำปฏิกิริยาของซิลิคอนในตัวอย่างที่ย่อยกับ ammonium molybdate, HCl 1:1, oxalic acid และ reducing agent แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 815nm โดยใช้ UV-vis spectrophotometer (HACH DR/4000, 48000, Loveland, Colorado) ที่ 815nm ที่อุณหภูมิห้อง ซิลิคอนมาตรฐานเตรียมจาก silicon atomic absorption standard solution เข้มข้น 100ppm ละลายใน 1.9% NaOH (Sigma) ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง

2.4 การวัดปริมาณแคลเซียมในดอกเห็ด

นำตัวอย่างครีบและก้านที่อบแห้ง บดละเอียดตามข้อ 2.3 มา wet-digested โดยใช้ HNO_3 และ $HClO_4$ วัดปริมาณแคลเซียมโดยใช้ atomic absorption spectrophotometry (GBC model Avanta PM, Australia) ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง

2.5 การวัดเนื้อสัมผัส

การวัดเนื้อสัมผัสด้านความแน่นเนื้อ (Firmness) โดยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron texture machine) โดยสุ่มตัวอย่างเห็ดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบ 7cm ตัดตัวอย่างครีบดอกเห็ดเป็นชิ้นขนาด 2 x 1cm ที่ตำแหน่งเดียวกันทุกครีบ ส่วนก้านดอกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm แล้วตัดให้ยาวประมาณ 3cm วัดเนื้อสัมผัสในรูปค่า shear values โดยใช้ Universal Testing Machine (4411, Instron Laboratory Inc., USA) ที่ติดกับ Warner-Bratzler shear cell ค่าเนื้อสัมผัสที่วัดคือค่าแรงสูงสุดที่ใช้ในการตัดชิ้นครีบและก้านดอก ค่าความแน่นเนื้อได้จากค่าเฉลี่ยที่วัดจากชิ้นตัวอย่างอย่างน้อย 10 ชิ้น

2.6 Solid content

สุ่มตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบ 7cm และก้านดอกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งตัวอย่างที่หั่นแล้วมา 100g ใส่ในถ้วย สแตนเลสสำหรับวัดความชื้น อบตัวอย่างในตู้อบ (ShelLab, 1375FX, Cornelis, Oregon) ที่ 105°C เป็นเวลา >12h จนน้ำหนักของตัวอย่างไม่เปลี่ยนแปลง นำตัวอย่างที่อบแล้วไปพักให้เย็นในโถดูดความชื้นก่อนแล้วจึงชั่งน้ำหนัก (Mamiro and Royse 2008)

2.7 Centrifugal drip loss

ค่า drip loss หาโดยวัดปริมาณน้ำที่สูญเสียหลังจากการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (ดัดแปลงจาก Redmond et al. 2004) สุ่มตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบ 7cm และ

ก้านดอกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm แล้วหั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5cm ชั่งตัวอย่างที่หั่นแล้วประมาณ 5g ใส่ใน paper filter thimble แช่เย็นที่ -80 °C เป็นเวลา 18 ชม. วางในหลอด centrifuge ที่ใส่ glass beads ขนาด 20 มม. อยู่ด้านล่างปล่อยให้ตัวอย่างละลายแล้ว centrifuge ตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 223xg เป็นเวลา 10min ที่ 10 °C หลังจาก centrifuge แล้วชั่งตัวอย่างอีกครั้ง คำนวณค่า drip loss

$$\text{drip loss (\%)} = \frac{(w_i - w_f)}{w_i} \times 100 \qquad (2.2)$$

wi คือ น้ำหนักเริ่มต้น, wf คือ น้ำหนักสุดท้าย วัดซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

2.8 การดูดซึมแคลเซียมและซิลิคอนของเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลว

อาหารเหลวที่ใช้คือ WPDY (wheat grain–potato–dextrose–yeast extract) เนื่องจากเส้นใย *Pleurotus ostreatus* เจริญได้ดีและให้ biomass สูงที่สุดจากรายงานของ Serafin Munˉ oz *et al.* (2006) อาหารเหลว WPDY เตรียมโดยต้มเมล็ดข้าวสาลี 400g กับมันฝรั่งปอกเปลือกหั่นชิ้น 300g ในน้ำกลั่น 600ml (100°C เป็นเวลาประมาณ 1h กรองเอาส่วนน้ำโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no. 1 นำส่วนน้ำที่กรองได้มาผสมกับส่วนผสมอื่นๆได้แก่ dextrose 20g yeast extract 2g $MgSO_4$ 0.5g KH_2PO_4 0.5g และ NaCl 1.0g แล้วจึงปรับปริมาตรของส่วนผสมเป็น 1 ลิตร ด้วย deionized water (pH 5.0 ± 0.5) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15min จากนั้นเติมสารละลาย sodium metasilicate ($Na_2Si_3 \bullet 5H_2O$, Ajax Finechem) และ calcium sulfate ($CaSO_4 \bullet 2H_2O$, Ajax Finechem) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้การกรองผ่านเมมเบรน 0.45mm ลงในอาหารเหลวเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10mg/l silicon และ 5, 10mg/l calcium และ 5mg/l silicon + 5mg/l calcium

เชื้อเห็ดภูฏานเบอร์ 3 บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองอยู่ในรูปเส้นใยในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) ได้มาจากกลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นำแม่เชื้อที่ได้มาต่อเชื้อในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) หลังจากบ่มเส้นใยที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์หรือเมื่อเส้นใยสีขาวเจริญเต็มหน้าวุ้นใน Petri dishes จึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1cm^2 ถ่ายลงบนอาหารเหลวที่บรรจุใน flask ขนาด 50ml หลายๆขวด บ่มที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์หรือจนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเหลว ตัวอย่างควบคุมคือเส้นใยที่เจริญบนอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมสารละลายซิลิคอนและ/หรือแคลเซียม การแยกเส้นใยออกจากอาหารเหลวทำโดยกรองอาหารเหลวออกจากเส้นใยผ่านกระดาษกรอง แล้วล้างเส้นใยที่แยกออกมาหลายๆครั้งด้วย de-ionized water

เพื่อชะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ติดออกให้หมด นำเส้นใยที่แยกได้มาอบให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด ก่อนนำเส้นใยที่ได้มา wet-digest ตามวิธีใน ข้อ 2.3 และ 2.4 ก่อนนำไปหาปริมาณแคลเซียมและซิลิคอนโดยใช้ Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Perkin Elmer model PLASMA-1000)

2.9 Scanning electron microscope (SEM)

ศึกษาโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อเห็ดด้วย Scanning Electron Microscope (Leo1455VP) การเตรียมชิ้นตัวอย่างสำหรับ SEM ดัดแปลงจาก Ko *et al.* (2007) และ Zivanovic *et al.* (2000) fixed ตัวอย่างเห็ดสดและเห็ดกระป๋อง (ชิ้นตัดขวางของทั้งก้านและครีบดอก) ใน modified Karnovsky's fixative ซึ่งประกอบด้วย 2% glutaraldehyde และ 2% paraformaldehyde ใน 0.05M Cacodylate buffer ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 24 h ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างออกจาก fixative และล้าง 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์ ครั้งละ 5min นำชิ้นตัวอย่างมาทำให้แห้งด้วยการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% ที่ความเข้มข้นละ 5min และตามด้วยการแช่สองครั้งใน absolute ethanol ครั้งละ 5min นำชิ้นตัวอย่างใส่ในตะกร้าโลหะใน critical point dryer เพื่อทำ critical point drying นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งสนิทแล้วติดบน aluminum stubs แล้ว sputter-coated ด้วยทอง นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ส่องกล้องและถ่ายภาพด้วย SEM

2.10 การแปรรูปแบบใช้ความร้อน

นำตัวอย่างเห็ดสดมาแปรรูปเป็นเห็ดบรรจุกระป๋องหรือขวดแก้ว สุ่มตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบ 7.30 $\pm$ 2.26cm ตัดก้านดอกเห็ดให้เหลือยาวประมาณ 3cm ลวกเห็ดในน้ำเดือดเป็นเวลาประมาณ 30s ก่อนบรรจุ (ประมาณ 200g) ลงในขวดปากกว้างขนาด 12 ounces แล้วเติมสารละลาย 2% NaCl และ 0.05% citric acid ปิดปากขวดแล้วฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15min ในหม้อนึ่งความดัน ทำให้เย็นแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25^{o}C ก่อนการตรวจสอบคุณภาพในด้านเนื้อสัมผัสตามข้อ 2.5 ค่า weight gained และ grade losses

การวัด drain weight ของเห็ดบรรจุกระป๋องทำตามวิธีมาตรฐานคือชั่งน้ำหนักหลังจาก drain บนถาดเจาะรูเป็นเวลา 2min ส่วนการวัดขนาดครีบดอกทำโดยใช้ vernier caliper นำค่า drain weight และขนาดครีบดอกของทั้งเห็ดสดและเห็ดแปรรูปมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained และเปอร์เซ็นต์ grade losses ดังสมการ 2.3 และ 2.4

Weight gained (%) = $\frac{(w_d - w_i)}{w_i}$ x100 (2.3)

เมื่อ w_i น้ำหนักเห็ดสดก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน และ w_d ค่าน้ำหนัก drain weight ของเห็ดบรรจุกระป๋อง ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดอย่างน้อย 5 ซ้ำ

Size loss (%) = $\frac{(cd_i - cd_d)}{cd_i}$ x 100 (2.4)

เมื่อ cd_i คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบดอกของเห็ดสดก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน และ cd_d คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบดอกของเห็ดบรรจุกระป๋อง ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดอย่างน้อย 5 ซ้ำ

2.11 การแปรรูปแบบแช่เยือกแข็ง

เตรียมตัวอย่างเห็ดสดก่อนการแช่เยือกแข็งโดยการลวกในน้ำที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1min จากนั้นแช่ แข็งโดยใช้เครื่องแช่เยือกแข็งแบบแผ่นสัมผัส (Contact plate freezer)

การตรวจสอบคุณภาพ

- เนื้อสัมผัสหลังการละลายน้ำแข็งตามวิธีการในข้อ 2.5
- เปอร์เซ็นน้ำที่สูญเสียหลังการละลายน้ำแข็ง (weight loss) โดยวิธีของ Agnelli and Mascheroni (2002)

2.12 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (analysis of variance) และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ SPSS statistics 17.0 program