บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อเห็ดหอม (Lentinula edodes) สายพันธุ์ MU2 ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเชื้อเห็ดนางรม (Pleurotus oystreatus) สายพันธุ์นางรม 1 ของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร

2. วัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ประเภทได้แก่

2.1 อาหารธรรมชาติ (natural media) มีส่วนประกอบดังนี้

- วัสดุหลัก ได้แก่ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง ข้าวโพด หัวไชเท้า กล้วยน้ำว้า และมะละกอ
- วัสดุเสริม (อาหารเสริม) ได้แก่ น้ำมะพร้าว และ ยีสต์สกัด

2.2 อาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารและวิตามิน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Dextrose	Difco, U.S.A.
2. Glucose	Merck-Schuchardt, Germany
3. Yeast extract	Difco, U.S.A.
4. Potassium phosphate (KH_2PO_4)	May & Baker, England
5. Calcium chloride ($CaCl_2$)	May & Baker, England
6. Ammonium chloride (NH_4Cl)	May & Baker, England
7. L-aspartic acid	Sigma Chemicals, U.S.A.
8. Thiamine HCl	May & Baker, England

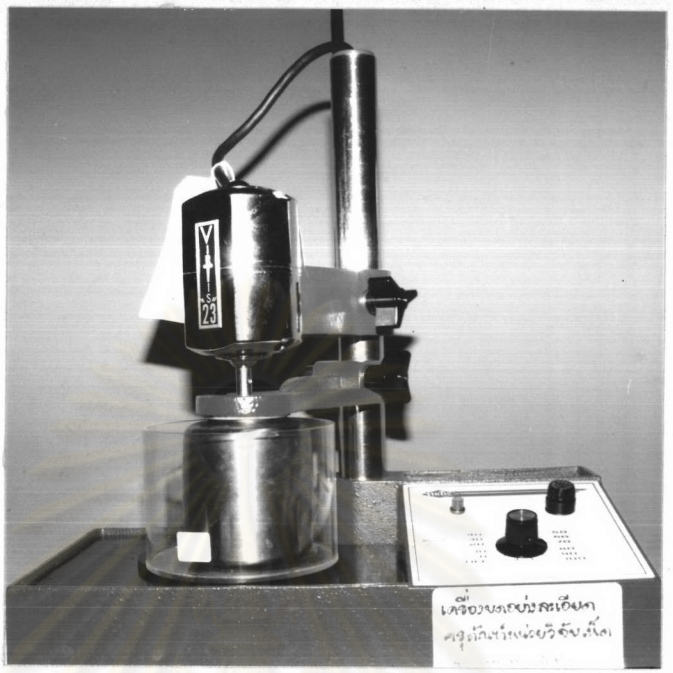
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
9. Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	May & Baker, England
10. Iron sulphate ($FeSO_4.7H_2O$)	May & Baker, England
11. Zinc sulphate ($ZnSO_4.7H_2O$)	May & Baker, England
12. Manganese sulphate ($MnSO_4.7H_2O$)	May & Baker, England
13. Octadecanol	Sigma Chemicals, U.S.A.
14. Hydrochloric acid (HCl)	May & Baker, England
15. Sodium hydroxide (NaOH)	May & Baker, England

3. อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. ชุดถังเลี้ยงเชื้อ (Fermentor)		
1.1 ปั๊มลมให้อากาศ	Sigma 4000-JW	Sigma, Western-Germany
1.2 Air flow meter	Dryer	Dryer Instruments, Michigan, U.S.A.
1.3 ชุดกรองอากาศประกอบด้วย		
ก. คอลัมน์แก้วขนาด 3 x 9 ซ.ม.	Pyrex (1001)	Bibby, England
ข. ใยแก้ว	Specialty	อาควอเรี่ยม จำกัด
1.4 จุกยาง	Extra	ปราณีภัณฑ์อุตสาหกรรม
1.5 ขวด reagent ขนาด 5,000 มิลลิลิตร	Pyrex (1526)	Bibby, England
1.6 ข้อต่อพลาสติกทนร้อนสูง	Connector	ปราณีภัณฑ์อุตสาหกรรม
1.7 หัวทรายพ่นอากาศขนาดยาว 4 นิ้ว	Air stone	อาควอเรี่ยม จำกัด

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
2. ขวดทดลอง (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	Pyrex (4980)	Bibby, England
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	ไฟฟ้า	Ta Chang Medical Instrument Factory Taiching, Taiwan, R.O.C
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Memmert	Memmert, Western Germany
5. ตู้ถ่ายเชื้อ	"ISSCO"Laminar Flow model H-124	International Scientific Supply Co., Thailand
6. เครื่องชั่งละเอียด	Precisa 80 A-200M	Memmert, Western Germany.
7. pH meter (Digital)	Meiji Model-5002	Meiji-Labax, Japan.
8. Homogenizer (ภาพที่ 1)	VIRTI "23"	The virtis company, New York
9. เครื่องเขย่า (ภาพที่ 2)	Shaker	ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
10.Micropipette	Finnpipette 2	Labsystems Oy Pulttie 9, Finland
11.Vacuum Pump	Hunter	Hamburg, Germany
12.Milipore	OM 037	International Scientific Supply, Company



ภาพที่ 1 เครื่องบดละเอียด (Homogenizer)

ภาพที่ 2 เครื่องเขย่า (Shaker)

4. วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ เครื่องเจาะจุก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร เข็มเขี่ยเชื้อ กระดาษกรองเบอร์ 1 กระดาษอลูมิเนียม สำลี ผ้าขาวบาง และกล้องถ่ายภาพ

วิธีการวิจัย

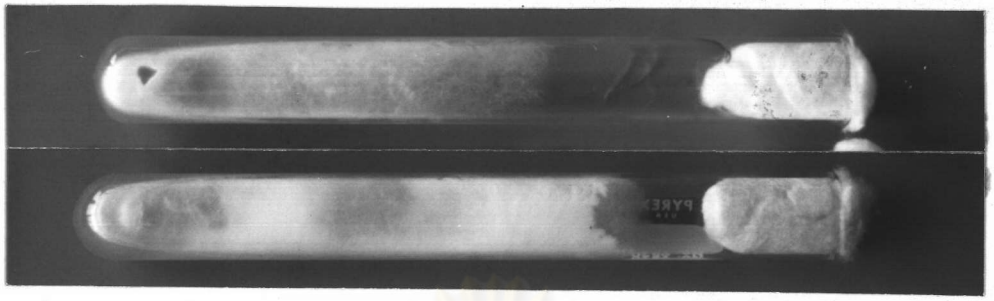
1. การเตรียมเชื้อเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลว

สรุปขั้นตอนการทดลองตามแผนภาพที่ 1 ส่วนรายละเอียดการดำเนินการศึกษามีดังนี้

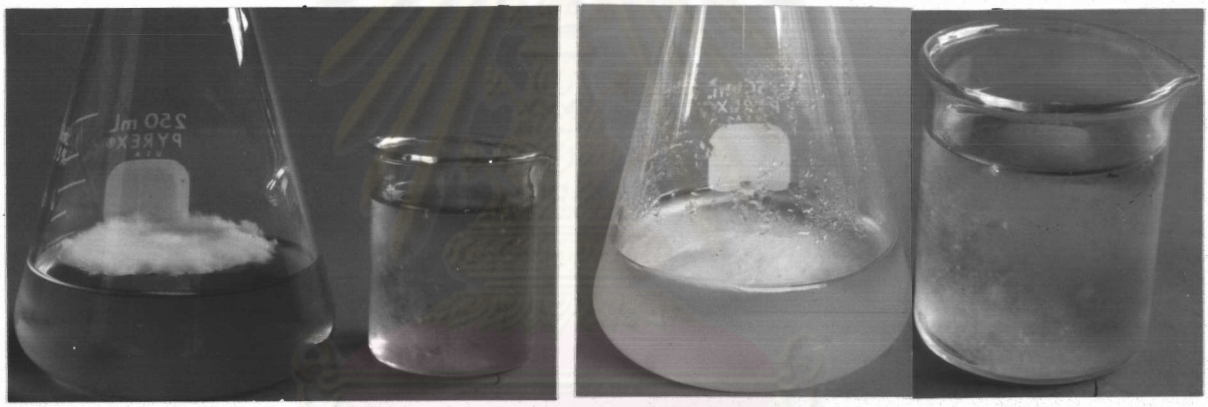
เตรียมหัวเชื้อเหลวใช้เชื้อเห็ดหอมและเห็ดนางรมซึ่งเก็บไว้ในหลอดเชื้ออาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)(ภาพที่ 3) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นำเชื้อเห็ดไปเพิ่มปริมาณเส้นใยโดยถ่ายเชื้อไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน สำหรับเห็ดหอมและ 5 วัน สำหรับเห็ดนางรม ตัดวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดหอม และเห็ดนางรมบริเวณรอบนอกสุดของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ค แล้วใช้เข็มเขี่ยตักชิ้นเชื้อเห็ดดังกล่าวย้ายไปลงบนอาหารเหลว PD (ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วันสำหรับเห็ดหอมและ 10 วันสำหรับเห็ดนางรม เมื่ออายุครบกำหนดนำเส้นใยเห็ดไปปั่นด้วยเครื่องบดละเอียด (homogenizer) (ภาพที่ 2) ที่ 15,000 r.p.m. เป็นเวลา 25 วินาที ทำในสภาพปลอดเชื้อ ได้หัวเชื้อเหลว (liquid spawn) ของเห็ดหอมและเห็ดนางรม (ภาพที่ 4) เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019121



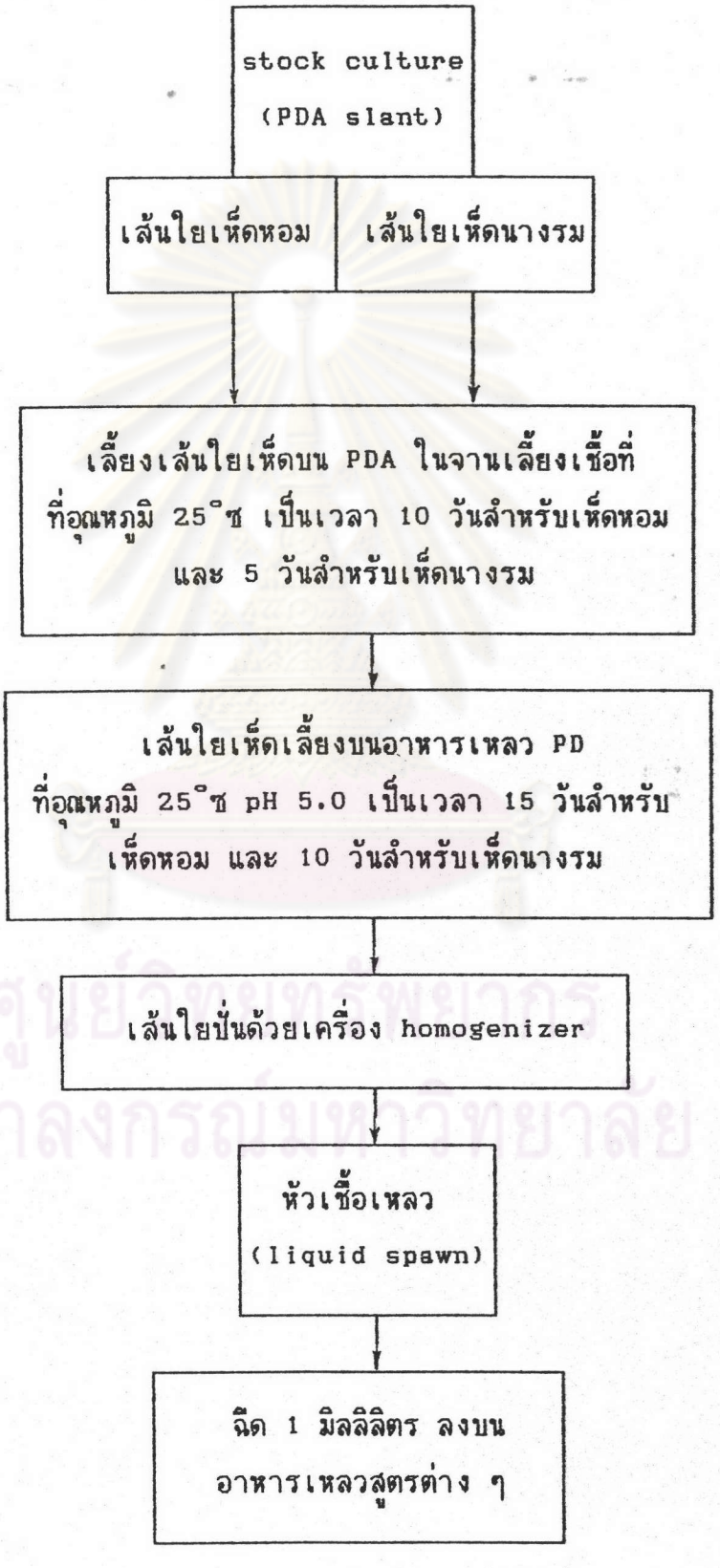
ภาพที่ 3 หลอดเชื้อเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม
A = เชื้อเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
B = เชื้อเส้นใยเห็ดนางรม สายพันธุ์ นางรม 1



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะหัวเชื้อเห็ดหอมและเห็ดนางรม
A = เส้นใยเห็ดหอมอายุ 15 วัน B = หัวเชื้อเหลวเห็ดหอม
C = เส้นใยเห็ดนางรมอายุ 10 วัน D = หัวเชื้อเหลวเห็ดนางรม

การใส่เชื้อ (inoculation) ทำโดยใช้ไมโครปิเปตดูดหัวเชื้อเหลวเห็ดหอมและเห็ดนางรม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (น้ำหนักแห้งเส้นใย 7.16^{-4} กรัม สำหรับเห็ดหอม และ 7.99^{-4} กรัม สำหรับเห็ดนางรม) ฉีดลงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร

แผนภาพที่ 1 สรุปขั้นตอนการเตรียมเชื้อเห็ด (inoculum) และการใส่เชื้อเห็ดในอาหารเหลว



2. ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลว 2 ประเภทคืออาหารธรรมชาติชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์

2.1 อาหารธรรมชาติ ได้แก่ มันฝรั่ง (Potato Dextrose, PD) มันสำปะหลัง (Cassava Dextrose, CaD) ถั่วเหลือง (Soybean Dextrose, SD) ข้าวโพด (Corn Dextrose, CoD) กล้วย (Banana Dextrose, BD) มะละกอ (Papaya Dextrose, PPD) และ หัวไชเท้า (White Raddish Dextrose, WRD) (ภาคผนวก ก)

2.2 อาหารสังเคราะห์ เตรียมตามสูตรของ Song et al., (1987) (ภาคผนวก ก)

การเก็บผลการทดลอง

- เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเป็นเวลา 60 วัน สำหรับเห็ดหอม และ 40 วัน สำหรับเห็ดนางรม สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 5 วัน โดยการกรองด้วย vacuum pump แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย hot air oven ร่วมกับการเก็บผลการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ ชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำ การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's New Multiple-Range test (DMRT) เพื่อหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม
- สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม ได้แก่ความหนาแน่นของเส้นใย ลักษณะโคโลนี การเปลี่ยนสีของเส้นใยและการสร้างตุ่มตอกและการสร้างดอกเห็ด

3. ศึกษาผลของการเติมอาหารเสริมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม

อาหารเสริมที่ใช้มี 2 ชนิดคือ น้ำมะพร้าว (Coconut juice) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ลิตร และยีสต์สกัด (Yeast extract) ปริมาตร 5 กรัม/ลิตร ผสมลงในชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 2 ตามปริมาตรที่กำหนด ตวงอาหารเหลว 100 มิลลิลิตรในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตร ปรับ pH 5.0 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่อง autoclave ทิ้งอาหารเหลวไว้ให้เย็นลงใส่เชื้อ (inoculation) เห็ดหอมหรือเห็ดนางรม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การเก็บผลการทดลอง : เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใย โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2 เพื่อหาอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด

4. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลวที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 3 แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนตัวอย่างวัดความเป็นกรดเป็นด่างด้วย pH meter ปรับให้เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ใช้ความเข้มข้นและปริมาณของ 1 N HCl หรือ 1N NaOH ที่ใช้สำหรับตัวอย่างที่ไปปรับ pH เป็น ส่วนที่เหลือให้เป็น 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ทำในสภาพปราศจากเชื้อ ในอาหารเหลวที่เหมาะสม 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่อง autoclave ใส่เชื้อเหลวเห็ดหอมและเห็ดนางรม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การเก็บผลการทดลอง : เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2 เพื่อหาระดับความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด (วิเคราะห์ทางสถิติดังในตัวอย่างภาคผนวก ข)

สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม ได้แก่ ระยะเวลาเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารในขวดทดลอง และความหนาแน่นเส้นใย

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลวที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 4 ที่ปราศจากเชื้อแล้วใส่หัวเชื้อเหลวเห็ดหอมและเห็ดนางรม มาศึกษาต่อที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือบ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียสในห้องปรับอากาศ กับ 30 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

การเก็บผลการทดลอง : เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2 เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด

แล้วนำข้อมูลวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม เช่นเดียวกับข้อ 4

6. <u>ศึกษาผลของสภาพการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในสภาพแบบนิ่ง (stationary) กับแบบกึ่งนิ่ง (semi-stationary) ในอาหารเหลวที่เหมาะสม</u>

โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 5 ปริมาณ 100 มิลลิลิตรในขวดทดลอง 250 มิลลิลิตรนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาทีด้วยเครื่อง autoclave ใส่เชื้อเหลวเห็ดหอมและเห็ดนางรมปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาศึกษาต่อที่สภาพการเลี้ยงเส้นใย 2 สภาพคือ

ก. สภาพการเลี้ยงแบบนิ่ง คือ เป็นการเลี้ยงเส้นใยไว้ในสภาพที่ไม่มีการเขย่า

ข. สภาพการเลี้ยงแบบกึ่งนิ่ง โดยมีการเขย่าวันละ 2 ครั้ง ๆ ละครึ่งชั่วโมงที่ความเร็ว 112 r.p.m. บนเครื่องเขย่า (shaker) (ภาพที่ 3)

การเก็บผลการทดลอง : เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5 เพื่อหาสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด และสังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม ได้แก่ ลักษณะโคโลนี การเปลี่ยนสีของเส้นใย และการสร้างตุ่มดอก

7. <u>การขยายส่วนการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในถังเลี้ยงเชื้อ</u>

เลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 6 ปริมาตรอาหารเหลว 5 ลิตร ในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ลิตร ให้อากาศ 2 SCF/H (aerated) ใส่สารกำจัดฟองด้วย octadecanol 1 มิลลิลิตร/5 ลิตร เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ลิตร แต่ไม่ให้อากาศ(non-aerated) ที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่อง autoclave ใส่หัวเชื้อเหลวเห็ดหอมและเห็ดนางรมปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ถังเลี้ยงเชื้อ (Fermentor) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบขึ้นเองและใช้วัสดุอุปกรณ์ภายในประเทศ (ภาพที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยปั๊มให้อากาศเป็นตัวให้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อากาศเข้าไปในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ลิตร โดยอากาศนี้จะถูกกรองให้ปราศจากเชื้อด้วยชุดกรองอากาศจำนวน 3 ชุด และมีตัวพ่นอากาศอยู่ภายในถังมีลักษณะเป็นหัวทราย มีท่อให้อากาศออกพร้อมชุดกรองอากาศ 1 ชุด

การเก็บผลการทดลอง : เก็บผลผลิตเห็ดเป็นน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของเส้นใยเห็ดโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5 สังเกตการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมได้แก่ ลักษณะโคโลนี การเปลี่ยนสีของเส้นใย และการสร้างตุ่มดอก

8. <u>การศึกษาคุณค่าทางอาหารของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม</u>

นำเส้นใยและดอกเห็ดอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงด้วย hot air oven แล้วนำไปบดเป็นผงใช้ในปริมาณ 1 กรัม ส่งผลไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บผลการทดลอง : หาปริมาณโปรตีนในเส้นใยเห็ด เปรียบเทียบกับดอกเห็ดด้วยวิธี Macro Kjeldah แล้วนำไปวิเคราะห์ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2 สรุปแผนการทดลอง

การเจริญของเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรมในอาหารเหลวธรรมชาติ PD CaD SD CoD WRD BD และ PPD เปรียบเทียบกับ SM

↓

ชนิดของอาหารเหลวที่คัดเลือกไว้

↓

ศึกษาผลของการเติมอาหารเสริมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด

↓

อาหารเหลวที่เหมาะสม

↓

ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ปรับ pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0

↓

pH ที่เหมาะสม

↓

ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 25 °C และ 30 °C ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลวที่เหมาะสม

↓

อุณหภูมิที่เหมาะสม

↓

ศึกษาผลของสภาพการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมแบบนิ่งกับแบบกึ่งนิ่ง ในอาหารเหลวที่เหมาะสม

↓

สภาพการเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่เหมาะสม

↓

ขยายส่วนการเลี้ยงเส้นใยเห็ดในถังเลี้ยงเชื้อขนาด 10 ลิตร

↓

ผลผลิตเส้นใยเห็ดหอมและเห็ดนางรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย