

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ผักผลไม้แปรรูปโดย
ซิลิคอนและแคลเซียม: กรณีศึกษาในเห็ดแปรรูป

คณะผู้วิจัย

1. ดร.ทิพวรรณ ทองสุข มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กงบังเกิด มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Executive Summary	2
บทที่ 1 บทนำ	4
บทที่ 2 วัตถุประสงค์และวิธีการ	17
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
บทที่ 4 สรุปผลการศึกษา	47
เอกสารอ้างอิง	48
Output ที่ได้จากโครงการ	55
ภาคผนวก	56

สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1.1 สมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของซีโอไลท์ ไครน็อฟติโลไลท์ ภูไมท์ และสเมกไทต์	16
Table 2.1 Summary of substrate formulations	19
Table 3.1 The time period of different phases of oyster mushroom cultivation, yield and percentage BE of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.	26
Table 3.2 Size classes (small, medium, large) expressed as a percentage of the total mushroom production per treatment. Quantiles 33.3% (6.70 g) and 66.6% (12.28 g) were used to delimit mushroom size classes (small, medium, large), mushroom cap diameter (cm) and firmness (kgf) of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.	30
Table 3.3 The calcium content (mg/g dry wt.) and silicon content (mg/g dry wt.) of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.	31
Table 3.4 The calcium content (mg/g dry wt.) and silicon content (mg/g dry wt.) in mycelia of <i>Pleurotus ostreatus</i> grown on WPDY medium	39
Table 3.5 Percentage of weight gained and size loss and firmness (kgf) of canned mushrooms. Mushrooms were cultivated in substrates supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.	41
Table 3.6 Percentage of weight loss and size loss and firmness (kgf) of frozen mushrooms. Mushrooms were cultivated in substrates supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.	42

Figure 3.1 a.) A histogram showing the distribution of individual (2,848) mushroom weights. Quantities 33.3% (6.70 g) and 66.6% (12.28 g) were used to delimit mushroom size classes (small, medium, large) b.) A histogram showing the distribution of individual (2,848) mushroom cap diameter showing normal distribution curve with mean of 7.3 cm and standard deviation of 2.26 cm. The caps with diameter of 7.3 ± 2.26 cm were used to produce canned mushrooms.	29
Figure 3.2 The percentage drip loss and solid content of the caps and stalks of oyster mushrooms grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice. Means followed by the same letter in the same column in the same set of supplement are not significantly different according to the Duncan test ($P \geq 0.05$)	40
Figure 3.3A Scanning electron micrographs showing a cross section of stalks of <i>P. ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented (a) supplemented with gypsum (b) pumice sulfate (c) and pumice (d) after thermal treatment. (Canned mushroom; 500x magnification) For each sample, the image was the representative image from 3 different samples randomly collected from at least 10 canned mushrooms. Only mushroom caps with diameter of 7 cm and mushroom stalks with 1 cm thickness were chosen.	43
Figure 3.3B Scanning electron micrographs showing a cross section of stalks of <i>P. ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented (a) supplemented with gypsum (b) pumice sulfate (c) and pumice (d) after thermal treatment. (Canned mushroom; 100x magnification)	44
Figure 3.3C Scanning electron micrographs showing a cross section of caps of <i>P. ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented (a) supplemented with gypsum (b) pumice sulfate (c) and pumice (d) after thermal treatment. (Canned mushroom; 500x magnification) For each sample, the image was the representative image from 3 different samples randomly collected from at least 10 canned mushrooms. Only mushroom caps with diameter of 7 cm and mushroom stalks with 1 cm thickness were chosen.	45
Figure 3.3D Scanning electron micrographs showing a cross section of caps of <i>P. ostreatus</i> grown on substrates non-supplemented (a) supplemented with gypsum (b) pumice sulfate (c) and pumice (d) after thermal treatment. (Canned mushroom; 100x magnification)	46

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของการเติมยิบซัม (แหล่งของแคลเซียม) ภูไมท์ (แหล่งของซิลิคอน) และภูไมท์ซิลเฟต (แหล่งของซิลิคอนและแคลเซียม) ลงในวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*) การเติมภูไมท์ในวัสดุเพาะที่ระดับมากถึง 30% ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตรวม ขนาดดอกและเส้นผ่านศูนย์กลางที่รับดอก การเติมยิบซัมในวัสดุเพาะที่ระดับ 10% ลดปริมาณผลผลิตรวม และถึงแม้การเติมยิบซัมในวัสดุเพาะที่ระดับ 5% ไม่ได้ลดปริมาณผลผลิตรวม แต่มีผลในการเพิ่มสัดส่วนดอกเห็ดขนาดใหญ่ การเติมภูไมท์ซิลเฟตในวัสดุเพาะที่ระดับมากถึง 10% (> 10%) มีผลในการลดผลผลิตรวม การเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซิลเฟต ในวัสดุเพาะสำหรับการผลิต *P. ostreatus* ไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมและซิลิคอนในก้านดอกและศรีบริดดอกของ *P. ostreatus* แต่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพโดยมีผลในการเพิ่มค่า drip loss ค่า solid content และค่า centrifugal drip loss นอกจากนี้ค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained ของเห็ดบรรจุกระป๋องของเห็ดที่เพาะบนวัสดุเพาะที่เติมยิบซัม ภูไมท์ซิลเฟตและภูไมท์สูงกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained ของเห็ดอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ภาพถ่ายจาก SEM แสดงว่า hyphae ของเห็ดที่เพาะวัสดุเพาะที่มีการเติมซิลิคอนและหรือแคลเซียมมีลักษณะการงอตัวกันหนาแน่นกว่าตัวอย่างควบคุม

คำสำคัญ: *Pleurotus ostreatus* แคลเซียม ซิลิคอน เนื้อสัมผัส

Abstract

Gypsum (calcium source), pumice (silicon source), and pumice sulfate (silicon and calcium source) were supplemented into substrates for oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). The addition of pumice up to 30% had no effect on total yield, size distribution and caps diameter. The supplementation of gypsum at 10% decreased total yield and although gypsum at 5% did not affect total yield, the treatment increased the proportion of large-sized caps. Too much content (> 10%) of pumice sulfate resulted in the lower yield. Calcium and silicon contents in the fruit bodies were not influenced by supplementations. The centrifugal drip loss values and solid content of fresh mushrooms and percentage of weight gained and firmness of canned mushrooms cultivated in substrates supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice were significantly ($p < 0.05$) higher than those of the control. SEM revealed the more compacted hyphae of mushroom stipes supplemented with silicon and/or calcium after heat treatment comparing to the control.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, calcium, silicon, texture

Executive Summary

ปัจจัยสำคัญในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้แปรรูปคือคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส เนื้องอกจากการแปรรูปผักผลไม้ทำให้สูญเสียเนื้อพืชส่งผลให้เกิดการสูญเสียปัจจัยคุณภาพสำคัญด้านนี้ โดยง่าย วิธีการในอุตสาหกรรมที่ช่วยในการรักษาเนื้อสัมผัสคืออาศัยหลักการทำงานของแคลเซียมร่วมกับเบนโซเอตเพกทินเมทิลเอสเทอเรส (pectin methyl esterase) ซึ่งมีข้อจำกัดหลายด้าน โดยเฉพาะปัจจัยที่ควบคุมความสม่ำเสมอในการแพร่กระจายของแคลเซียมในเนื้อเยื่อพืชซึ่งควบคุมได้ยากและความแตกต่างทางกายภาพของผักผลไม้แต่ละชนิดทำให้วิธีการนี้ยังไม่มีประสิทธิภาพสมบูรณ์ งานวิจัยนี้มีแนวคิดในการพัฒนาเทคโนโลยีการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เกษตรแปรรูป โดยการใช้ธาตุอาหารเพิ่มความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อพืชได้แก่ซิลิกอนและแคลเซียมระหว่าง การเพาะปลูก การมีหนึ่งเซลล์ที่แข็งแรงจะลดความรุนแรงของการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์เมื่อ ผลไม้ถูกนำไปแปรรูปโดยใช้ความร้อน และยังช่วยลดการทำลายเซลล์พืชเนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจากการกระบวนการแช่เยือกแข็ง

เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง และเป็นพืชอาหารที่มีคุณค่าและมีศักยภาพด้านการตลาดสูง นอกจากนี้เห็ดนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย ถึงแม้โครงสร้างของเห็ดจะไม่ซับซ้อนเท่าโครงสร้างของพืชแต่เนื้อเยื่อของเห็ดประกอบด้วย เซลล์ที่มีผนังเซลล์คล้ายกับพืชทั่วไป และการเพาะเห็ดให้ผลผลิตในระยะเวลานาน และสามารถผลิตปริมาณมากพอสำหรับการแปรรูป ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ ผลการศึกษาที่ได้อาจเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ผักผลไม้แปรรูปชนิดอื่นๆ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิด ความเข้มข้น และอัตราการดูดซึมของสารเพิ่มความแข็งแรง แก่เนื้อเยื่อพืช (แคลเซียมและซิลิกอน) ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการแปรรูปใช้ ความร้อนและการแช่เยือกแข็ง

2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการแปรรูป เพื่อเปรียบเทียบ ความแตกต่างของเนื้อเยื่อระหว่างตัวอย่างที่ใช้และไม่ใช้ธาตุอาหารเพิ่มความแข็งแรง แก่เนื้อเยื่อ

ผลการศึกษาพบว่า การเติมเกลือ (แหล่งของซิลิกอน) ในวัสดุเพาะสำหรับการผลิต *P. ostreatus* ที่ระดับมากถึง 30% ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตรวม ขนาดดอกและเส้นผ่านศูนย์กลาง ตรีบดอก การเติมยิปซัมในวัสดุเพาะที่ระดับ 10% ลดปริมาณผลผลิตรวม และถึงแม้การเติมยิปซัม (แหล่งของแคลเซียม) ในวัสดุเพาะที่ระดับ 5% ไม่ช่วยลดปริมาณผลผลิตรวมแต่มีผลในการเพิ่ม สัดส่วนดอกให้ขนาดใหญ่มากขึ้นซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แปรรูป การเติมเกลือโซเดียมเฟต (แหล่ง ของซิลิกอนและแคลเซียม) ในวัสดุเพาะที่ระดับมากเกินไป (> 10%) มีผลในการลดผลผลิตรวม

การเติมยิบซัม ภูเขาไฟ และภูเขาไฟฟูจิ ในวัสดุเพาะไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในก้านดอกและศรีษะดอก *P. ostreatus* ไม่สะสมฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อ แม้ว่าแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เติมไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อ แต่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพโดยมีผลในการเพิ่มค่า drip loss และค่า solid content การเพิ่มขึ้นของค่า centrifugal drip loss บ่งบอกว่าเนื้อเยื่อเยื่อเกิดการเติมยิบซัม ภูเขาไฟ และภูเขาไฟฟูจิ มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้มากขึ้นซึ่งอาจเป็นผลส่วนหนึ่งมาจากการที่ hyphae ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานที่รวมตัวเป็นเนื้อเยื่อเยื่อเกิดความหนาแน่นมากขึ้นดังค่า solid content ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained ของเห็ดบรจุกระป๋องของเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัม ภูเขาไฟฟูจิและภูเขาไฟฟูจิสูงกว่าค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained ของตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าถ้าทำให้เห็ดสดก่อนการแปรรูปเท่ากัน เห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัม ภูเขาไฟฟูจิและภูเขาไฟฟูจิ จะให้เห็ดกระป๋องที่มี drain weight มากกว่าตัวอย่างควบคุมประมาณ 20%

ภาพถ่ายจาก SEM แสดงว่า hyphae ของเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่มีการเติมฟอสฟอรัสและหรือแคลเซียมมีลักษณะการเกาะตัวกันหนาแน่นกว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งสัมพันธ์กับค่าความหนาแน่นของเห็ดบรจุกระป๋องที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

ดังนั้นการเติมภูเขาไฟฟูจิในวัสดุเพาะเห็ด *P. ostreatus* ที่ 20% ของน้ำหนักวัสดุเพาะเป็นวิธีทางเลือกในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเห็ดบรจุกระป๋องเนื่องจากวิธีนี้ช่วยเพิ่ม drain weight และความหนาแน่นของเห็ดบรจุกระป๋องเนื่องจากจากการเติมภูเขาไฟฟูจิในวัสดุเพาะกระตุ้นให้ hyphae เกาะตัวกันหนาแน่นขึ้นทำให้เนื้อเยื่ออุ้มน้ำได้มากขึ้นส่งผลให้เนื้อสัมผัสแข็งขึ้น การใช้ยิบซัมและภูเขาไฟฟูจิอาจไม่เหมาะสมเท่าภูเขาไฟฟูจิเนื่องจากส่งผลในการลดปริมาณผลผลิตเมื่อปริมาณแคลเซียมฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นสูงกว่าระดับที่เหมาะสม

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ผักผลไม้เป็นสิ่งที่เก็บรักษาให้คงสภาพความสดไม่ได้นาน จึงได้มีการพยายามคิดค้นวิธีการแปรรูปและถนอมอาหารในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้สามารถเก็บไว้บริโภคได้ตลอดปี การแปรรูปและถนอมอาหารยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เกษตรและยังนำไปสู่การลงทุนผลิตเป็นสินค้าอุตสาหกรรมเพื่อการค้าและพาณิชย์ทั้งในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนา เศรษฐกิจและสังคมของประเทศ ปัจจุบันตลาดสินค้าเกษตรแปรรูปมีคู่แข่งทางการค้าเกิดขึ้นหลาย ประเทศเช่น จีน เวียดนาม สินค้าเกษตรแปรรูปของไทยจึงต้องมีการพัฒนาด้านคุณภาพอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้ได้สินค้าที่มีคุณภาพดีกว่าหรือทัดเทียม เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับคู่แข่งอื่นๆได้

หัวใจหลักของการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้แปรรูปคือคุณภาพของผลิตภัณฑ์ด้านต่างๆโดยเฉพาะด้านเนื้อสัมผัส เนื่องจากการแปรรูปผักผลไม้ส่งผลให้เกิดการสูญเสียปัจจัยคุณภาพสำคัญด้านนี้ได้ง่าย มีการคิดค้นเทคนิคต่างๆเพื่อปรับปรุงคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์แปรรูป หนึ่งในขั้นตอนสำคัญในกระบวนการผลิตผักผลไม้แปรรูปโดยเฉพาะผักผลไม้บรรจุกระป๋องและขวดแก้ว ผัก ผลไม้แช่แข็ง ผักผลไม้แปรรูปเล็กน้อย (minimally processed fruits and vegetables) คือการแช่ในสารเพิ่มความกรอบ (firming agents) ซึ่งเป็นเกลือของแคลเซียม เช่น แคลเซียมคลอไรด์ แคลเซียม คาร์บอเนต แคลเซียมไดออกไซด์ แคลเซียมซิเตรด (กองส่งเสริมเทคโนโลยี 2537) เป็นที่ทราบมานานว่าแคลเซียมช่วยเพิ่มความกรอบของผักและผลไม้ได้ เนื่องจากการที่แคลเซียมมีปฏิสัมพันธ์กับผนังเซลล์ของพืช เกล็ดของแคลเซียมจับกับกรดคาร์บอกซิลิกอิสระบนสายของกรดกาแลกทูโรนิกซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเพกทินทำให้เกิดการเชื่อมต่อ (cross-linking) ระหว่างสายเพกทิน การเพิ่มขึ้นของการเชื่อมต่อระหว่างสายเพกทินในเมล็ดเล็ลลา (middle lamella) ระหว่างเซลล์ นำไปสู่เนื้อสัมผัสของพืชที่แข็งขึ้น (Anthon *et al.* 2005) แต่อัตราการแข็งขึ้นของเนื้อสัมผัสของพืชโดยการแช่ในสารละลายที่มีแคลเซียมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักที่สำคัญคือ ความมากน้อยที่หุ้มเพกทินบนสายเพกทินที่ถูกเอสเตอร์เฟตซึ่งควบคุมโดยการทำงานของเอนไซม์เพกทินเมทาเลสเทอเรส (pectin methyl esterase, PME) ถ้าอัตราการทำงานของเอนไซม์ PME สูงจะช่วยเพิ่มตำแหน่งที่ Ca^{2+} จับกับสารเพกทินได้ พบว่าการเติมเอนไซม์ PME บริสุทธิ์ลงไปส่งเสริมความสามารถของ Ca^{2+} ที่จะเพิ่มความแข็งของมะเขือเทศหั่นชิ้น (diced tomatoes) แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดคือราคาของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ใช้ และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่จำกัดในผักผลไม้ที่เป็นชิ้นเนื่องจากการสัมผัสของเอนไซม์กับชั้นสเตรคเป็นไปไดยาก

อีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มการทำงานของไอโซม์ PME คือ การปรับ pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ซึ่งประมาณ 7 แต่ก็ขึ้นอยู่กับจำกัดสำหรับผักผลไม้บางชนิดที่สัมผัสได้เป็นกรด เช่น มะเขือเทศ

อีกวิธีที่นิยมใช้เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ PME กับกระบวนการเติมแคลเซียมคือการลวกโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 50 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ วิธีนี้นิยมใช้เพิ่มความแข็งให้กับผลิตภัณฑ์แปรรูปสุดท้ายในผักผลไม้หลายชนิด (Bartolome and Hoff 1972; Ni *et al.* 2005)

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการศึกษาเรื่องแคลเซียมช่วยเพิ่มความกรอบของผักและผลไม้จะทำให้มานาน นโยบายที่ได้รับในทางอุตสาหกรรมกับตัวผลิตภัณฑ์สุดท้ายยังมีข้อจำกัดทั้งนี้เนื่องจาก การแข็งขึ้นของเนื้อสัมผัสของพืชโดยการแช่ในสารละลายที่มีแคลเซียมนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายด้าน ดังที่กล่าวมาแล้วรวมทั้งปัจจัยหนึ่งที่สำคัญคือขนาดชิ้นของผลิตภัณฑ์ซึ่งมีผลต่ออัตราการซึมผ่านของความร้อนและแคลเซียมที่ต้องควบคุมให้ถูกต้องผลที่ได้รับจึงจะเป็นไปอย่างทีละตัว

อัตราการแพร่เข้าไปในเนื้อผักผลไม้ของ Ca^{2+} หรือเอนไซม์ PME ที่เติมลงไปมีผลกระทบต่อการเพิ่มความแข็งของเนื้อ มีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้ความดันสูงในการเร่งการแพร่เข้าไปในเนื้อ ผักผลไม้ของ Ca^{2+} หรือเอนไซม์ PME (Infusion Technique) พบว่าได้ผลดีมากในการเพิ่มความแข็งของเนื้อ (Okamoto and Fujishima 2004) แต่ก็ยังมีความเป็นไปได้ยากในเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากปัญหาการลงทุนด้านเครื่องจักรที่มีราคาสูง

ดังนั้นการค้นคว้าวิธีการใหม่ในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผักผลไม้แปรรูปจึงมีความจำเป็น เทคโนโลยีการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผักผลไม้ก่อนการเก็บเกี่ยวโดยการเพิ่มความแข็งแรงของพืช ก่อน เก็บเกี่ยวเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผักผลไม้แปรรูป

ธาตุอาหารที่พบว่ามีผลสำคัญต่อความแข็งแรงหรือเนื้อสัมผัสของเนื้อเยื่อพืชคือ แคลเซียมและซิลิกอน (Si) ซิลิกอนเป็นธาตุอาหารที่มีอยู่มากมายเป็นพื้นผิวโลก แต่ไม่จัดเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชเหมือนแคลเซียม (ถนิมฉันท 2538) แต่ก็มีหลักฐานมากมายที่ระบุว่าพืชที่ได้รับซิลิกอนมากกว่าปกติให้ผลดีต่อการเจริญ การดูดซึมธาตุอาหาร ความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ความต้านทานต่อแมลงศัตรูและเชื้อรา (Epstein 1994)

มีการประยุกต์ใช้ซิลิกอนในรูปที่ละลายน้ำกับพืชหลายชนิด ซิลิกอนในรูปนี้ช่วยให้พืชดูด ซิลิกอนที่ละลายน้ำนั้นเข้าไปพร้อมกับการดูดน้ำของพืชผ่านทางท่อลำเลียงกระจายไปทั่วต้นพืช เมื่อ น้ำ ระเหยออกทางผิวของพืชและผนังเซลล์แต่ซิลิกอนจะเกาะไม่ได้อีกสะสมในพืชมากขึ้นโดยเฉพาะใน ผนังเซลล์ พบว่าทำให้พืชแข็งแรงทน ต่อโรค แมลง ไร เพลี้ย หนอนมากขึ้น การมีซิลิกอนที่พืชผัก มากขึ้นทำให้พืชผัก แข็งแรงกรอบอร่อยขึ้น เก็บรอการขายได้นานขึ้น ช้าหน่อย (ตีพร้อม 2541)

เนื่องจากวัตถุดิบที่ดีเป็นจุดเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีคุณภาพสูงจึงมีความคิดในการ เสริมธาตุอาหารที่เพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์พืช เช่น ซิลิกอน เพื่อปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบ (ผัก

ผลไม้) ที่จะนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในขั้นต่อไป การมีพลังงานเซลล์ที่แข็งแรงจะลดความรุนแรงของการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์เมื่อผักผลไม้ถูกนำไปแปรรูปโดยใช้ความร้อน และยังช่วยลดการทำลายเซลล์พืช เนื่องจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจากการระเหิดน้ำและการแช่เยือกแข็ง Rajashkar and Burke (1996) พบว่าการต้านทานของเซลล์พืชต่อการแช่เยือกแข็งมีอิทธิพลมาจากผนังเซลล์ เขาพบว่าสมบัติเชิงกลของผนังเซลล์มีผลโดยตรงกับการเคลื่อนน้ำออกจากเซลล์ซึ่งส่งผลให้เกิดเซลล์แห้งเหี่ยว (cell dehydration and collapse) มีคำแนะนำว่าควรเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญในการต้านทานการแช่เยือกแข็งของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยกระบวนการแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้การเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืชโดยการเพิ่มธาตุอาหารซิลิคอนหรือแคลเซียมระหว่างการแปรรูปผลไม้ประโยชน์เหนือกว่าการแช่ในสารละลายแคลเซียมที่นิยมทำกัน ในขั้นตอนการแปรรูปผักผลไม้ในแง่ความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของสารเพิ่มความแข็งแรงเนื่องจากการแข็งตัวของผนังเซลล์เกิดขึ้นในทุกๆเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช

ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของการเพิ่มธาตุอาหารเพื่อเพิ่มความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อพืช เช่น ซิลิคอน และแคลเซียมระหว่างขั้นตอนการแปรรูปผักผลไม้ด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์แปรรูป และรายงานเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการใช้วิธีการนี้เพื่อทดแทนหรือส่งเสริมขั้นตอนการจะสารเพิ่มความกรอบและการลดกัวยอของผักผลไม้ต่างๆกระบวนกรแปรรูปผักผลไม้ ซึ่งนอกจากจะเป็นการลดขั้นตอนในการผลิตและช่วยประหยัดพลังงานและกำลังคน ยังช่วยลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในผลิตภัณฑ์แปรรูป อีกทั้งเทคนิคนี้ยังมีแนวโน้มในการช่วยลดการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยไม่ต้องใช้สารเคมี

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.2.1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของชนิด ความเข้มข้น และอัตราการดูดซึมของสารเพิ่มความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อพืช (แคลเซียมและซิลิคอน) ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการแปรรูปแบบใช้ความร้อนและการแช่เยือกแข็ง

1.2.2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลังการแปรรูป เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเนื้อเยื่อระหว่างตัวอย่างที่ใช้และไม่ใช้ธาตุอาหารเพิ่มความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อ

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

1.3.1 ผลผลิตไม้แปรรูป

ผลผลิตไม้แปรรูปของไทยนับว่าเป็นอุตสาหกรรมที่สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสินค้าเกษตรของ ไทยเป็นอย่างมากและเป็นสินค้าอุตสาหกรรมการเกษตรซึ่งประเทศไทยส่งออกเป็นรายใหญ่นี้ในตลาดโลก ผลผลิตไม้แปรรูปที่ผลิตในประเทศไทยประกอบด้วย 4 กลุ่มหลักคือประเภทอบแห้ง ตอองบรรจุกระป๋อง และแช่เยือกแข็ง โดยมีโรงงานกระจายอยู่ทั่วประเทศกว่า 136 โรงงาน ภาพรวมการส่งออกผลไม้กระป๋องและผลไม้แปรรูปในปี 2551 ขยายตัวทั้งปริมาณและมูลค่า โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.62 ส่วนสินค้าประเภทผักสดแช่เย็น แช่แข็ง และแปรรูปนั้น มีปริมาณ 585,509 ตัน มูลค่า 18,256 ล้านบาท และการส่งออกในปี 2552 เพิ่มขึ้น 1,079,694 ตัน คิดเป็นมูลค่า 39,146 ล้านบาท สำหรับด้านการส่งออกน้ำผลไม้ของไทยนั้นมีการส่งออกทั้งสิ้น 306,954 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9,829 ล้านบาท มีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 10.47 และมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 20.79 (ข้อมูลอุตสาหกรรมอาหาร 12 สาขา 2010) ทั้งนี้ปัญหาด้านการแข่งขันที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นโดยเฉพาะคู่แข่งสำคัญคือ จีนและเวียดนาม ซึ่งมีศักยภาพในการผลิต แรงงานและพื้นที่เพาะปลูกได้เปรียบกว่าประเทศไทย โดยที่คู่แข่งสามารถผลิตสินค้าได้ปริมาณมากและมีความหนึ่งในกลยุทธ์การเพิ่มศักยภาพการแข่งขันด้านการตลาดของผักผลไม้แปรรูปคือการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะคุณภาพทางเนื้อสัมผัส เนื่องจากกระบวนการแปรรูปผักผลไม้ส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณภาพด้านนี้ได้ (กมล เลิศรัตน์ 2544) นอกจากนี้ความต้องการผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงของสด (fresh like) ทำให้เกิดความพยายามในการพัฒนาเทคนิคเพื่อการถนอมเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการแปรรูปให้เกิดการสูญเสียน้อยที่สุด ดังนั้นบทความนี้จะกล่าวถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียเนื้อสัมผัสระหว่างกระบวนการแปรรูปและรวบรวมเทคนิคที่ใช้รักษาสสมบัติด้านนี้ของผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ในอนาคต

ปัจจัยสำคัญสองประการที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียเนื้อสัมผัสระหว่างกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้นี้คือการสูญเสียความดัน (turgor pressure หรือ osmotic pressure) ภายในแวคิวโอล (vacuoles) และโปรโทพลาสต์ (protoplasts) ของเซลล์ซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสภาพของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างกระบวนการใช้ความร้อน ปัจจุบันยังไม่มีเทคนิคที่ช่วยลดการสูญเสียเนื้อสัมผัสเนื่องจากปัจจัยด้านนี้ ปัจจัยที่สองที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียเนื้อสัมผัสระหว่างการแปรรูปคือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์และเทคนิคเพื่อการถนอมเนื้อสัมผัสที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบันเกี่ยวข้องกับารลดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของผนังเซลล์

1.3.2 เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากพืช

ความต้องการการอาหารแปรรูปจากพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงของสดทำให้เกิดความพยายามในการพัฒนาเทคนิคเพื่อการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์สำหรับการแปรรูปโดยใช้ความร้อนเพื่อลดการเสื่อมสภาพด้านเนื้อสัมผัส แต่จะวิธีจะให้ค่าเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเฉพาะตัวต่างกัน มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก. การลวกที่อุณหภูมิต่ำ

การลวกที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 50-70 °C เป็นเวลาโดยทั่วไปประมาณ 30min ก่อนกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อนสูง ($\geq 100^{\circ}\text{C}$) มักกระทำเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากพืช เนื่องจากปฏิกิริยา β -elimination เกิดขึ้นกับสายกรดกลูตาเมตที่มีหมู่คาร์บอกซิลถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล (esterified galacturonic acid residues) เท่านั้น ดังนั้นการลดปริมาณเพกทินที่มีหมู่คาร์บอกซิลถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล จึงเป็นการลดการเกิดปฏิกิริยา β -elimination และลดการสูญเสียเนื้อสัมผัสระหว่างกระบวนการให้ความร้อน การลดการเกิดปฏิกิริยา β -elimination ทำได้โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PME วิธีที่นิยมใช้เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ PME คือการใช้อุณหภูมิในช่วง 50-70 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้การลวกที่อุณหภูมิต่ำยังเพิ่มโอกาสการเกิดเชื่อมโยยข้ามระหว่างสายเพกทิน

การลวกที่อุณหภูมิต่ำยังเพิ่มการยอมให้ผ่าน (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ซึ่งกระตุ้นการผ่านของแคตไอออน (cation) ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ PME อีกต่อหนึ่ง เนื่องจากการมีหรือไม่มีเยื่อหุ้มที่มีเวเลนซีเท่ากับ 2 (ทั้งที่เติมลงไปและที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช) มีความสำคัญ ดังนั้นมักจะนิยมใช้วิธีลวกที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับการแช่สารละลายแคลเซียม (Sila et al. 2008) ดังรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

ข. การล้าง, การจุ่มหรือการแช่สารความกรอบและทำให้เนื้อแน่น (Washing, dipping or infusion treatments)

สารที่ให้ความกรอบและทำให้เนื้อแน่นขึ้น (firming agents) เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (calcium salts) สารไฮโดรคอลลอยด์ (gelling hydrocolloids) และเอนไซม์ PME มักถูกใช้เพื่อเพิ่มความแข็งของเนื้อสัมผัสในอาหารแปรรูปจากพืช

• แคลเซียม

การใช้แคลเซียมมักใช้ลดการสูญเสียเนื้อสัมผัสของเนื้อเยื่อของผลิตภัณฑ์ผ่านการใช้ความร้อน พบว่าได้ผลดีกับผักผลไม้หลายชนิด เช่น กะหล่ำดอก (Hoozand and Doesburg 1961) พริกฮาลาพิโน (Jalapeno pepper) (Howard *et al.* 1994) และแครอท (Vu *et al.* 2004) เนื่องจากแคลเซียมสามารถจับกับสายกรดกลูตาเมตที่มีหมู่คาร์บอกซิลที่ไม่ถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล (demethoxylated polyuronides) การเชื่อมโยงข้ามระหว่างหมู่คาร์บอกซิลที่ไม่ถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอล (free carboxyl groups) ของสายพหุทินและแคลเซียมไอออนนำไปสู่การใช้เทคนิคการแช่สารละลายแคลเซียมอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการใช้แคลเซียมที่ความเข้มข้นสูงนำไปสู่รสชาติที่ไม่พึงปรารถนาแก่ผู้บริโภคและส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยา β -elimination (Sila *et al.* 2008)

แคลเซียมแลกเตท (calcium lactate) แคลเซียมโพรพิโอเนต (calcium propionate) และแคลเซียมกลูโคเนต (calcium gluconate) มีประโยชน์ในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสเช่นเดียวกับการใช้แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดรสขมและกลิ่นรสแปลกปลอมต่างและการใช้เกลือชนิดอื่นยังช่วยหลีกเลี่ยงการก่อตัวของสารก่อมะเร็ง (เช่น chloramines และ trihalomethanes) ซึ่งเกี่ยวข้องกับคลอไรด์ ประสิทธิภาพของแคลเซียมในฐานะสารที่ทำให้การรอบและทำให้เนื้อแน่นเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มเกลือที่วิตซีของ PME ดังนั้นจึงนิยมใช้การแช่สารละลายแคลเซียมกับการใช้ความร้อนต่ำ (mild heating) ร่วมกับเทคนิคการแทรกซึมโดยใช้สุญญากาศ (vacuum impregnation technology) จุดประสงค์ของเทคนิคนี้เพื่อปรับปรุงองค์ประกอบในวัตถุดิบอาหารโดยการเอาน้ำบางส่วนออกแล้วแทนที่ด้วยตัวละลาย (solutes) โดยไม่กระทบต่อความแข็งแรงของวัตถุดิบ ตัวผลิตภัณฑ์ของกระบวนการนี้อาจเป็นออสโมติกเกรเดียนต์ (osmotic gradient) ระหว่างตัวอย่งกับสารละลาย การใช้สุญญากาศตามด้วยการกลับไปที่บรรยากาศปกติ หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้อาจมีลักษณะไม่เป็นธรรมชาติและค่อนข้างเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งสูญญากาศที่ใช้ซึ่งอยู่ระหว่าง 5-200 mbar หรือความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ซึ่งอยู่ระหว่าง 20-75 °Bx

เมื่อเนื้อเยื่อที่มีรูพรุนถูกแช่ในสารละลายภายใต้สภาวะสุญญากาศ อากาศจะถูกสกัดออกจากรูขนาดเล็กเมื่อนำความดันปกติ (ความดันบรรยากาศ) สารละลายจะทะลุทะลวงเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์โดยการซึมตามรูขนาดเล็ก (capillary) และโดยเกรเดียนต์ความดัน (pressure gradient) เทคนิค impregnation ถูกใช้เพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสและการเสาริมชาต่ออาหาร (fortify) ผลิตภัณฑ์ มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้อย่างกว้างขวางในการแปรรูปผักและผลไม้โดยการแทรกซึมแคลเซียมชนิดต่างๆเข้าไปในเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Martín-Díaz *et al.* 2007)

- เอนไซม์ PME

การกระตุ้นแอคติวิตีของ PME ที่อยู่ภายในวัตถุดิบมักใช้กับอาหารที่มาจากพืชแต่การเติม PME จากภายนอกนิยมใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เนื้อและผลิตภัณฑ์บดละเอียดอื่นๆ อย่างไรก็ตามการพัฒนาระบบการแทรกซึมโดยใช้สุญญากาศ ทำให้สามารถนำ PME เข้าไปภายในรูพรุนของเมตริกของอาหารแข็งที่มีอากาศอยู่ภายใน เช่น สตรอเบอร์รี่ ได้ (Duvette *et al.* 2005) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ใช้ไม่ได้ผลกับวัสดุที่มีผิวที่ไม่ยอมให้ผ่าน (impermeable skin) หรือขาดช่องว่างภายใน เช่น เซอร์รี่ บลูเบอร์รี่ ถั่ว และข้าวโพด การใช้ PME จากภายนอก มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่มีภายในเนื้อเยื่อจากที่มีอยู่แล้วหรือทดแทนเอนไซม์ที่เสียสภาพไป PME ที่ได้จากทั้งพืชและจุลินทรีย์ (ราและแบคทีเรีย) (Sila *et al.* 2008)

การนำเอนไซม์จากภายนอกเข้าไปเพื่อเปลี่ยนลักษณะของเนื้อเยื่อเรียกว่า enzyme infusion มีวิธีการทำให้เกิดการแทรกซึมโดย 1) การแพร่หรือออสโมติกแบบไม่ใช้พลังงาน (passive osmotic diffusion) ข้อจำกัดของวิธีการนี้ มี 2 ประการคือ ความเป็นรูพรุนของผนังเซลล์ และขนาดของโมเลกุลที่ทำ infusion ยิ่งโปรตีนมีขนาดใหญ่การเคลื่อนเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ยิ่งทำได้ยากขึ้น 2) การซึมโดยอาศัยความดัน (pressure-assisted infusion) สำหรับสารละลายเอนไซม์ วิธีนี้ ได้ผลดีสำหรับเนื้อเยื่อที่มีที่ว่างภายในจำนวนมาก เมื่ออยู่ภายใต้ความดันสูงก๊าซ ที่อยู่ในโพรงอากาศในผักผลไม้จะถูกอัดและเข้าไปอยู่ในที่ว่างด้านในของเนื้อเยื่อ โพรงอากาศในเนื้อเยื่อจะถูกแทนที่ด้วยสารละลายเอนไซม์ เมื่อความดันกลับเข้าสู่สภาวะปกติ ก๊าซกลับเข้าสู่ตำแหน่งเดิมของเหลวจำนวนมากก็จะถูกดันออกมาจากเนื้อเยื่อ ในเนื้อเยื่อบางอย่างเช่น แอปเปิ้ล วิธีการนี้ใช้ได้ แต่ในเนื้อเยื่อเช่นเปลือกด้านในสีขาวของส้มฝรั่ง (albedo) การใช้ความดันสูงจะทำให้เนื้อเยื่อเสียรูปถาวรซึ่งป้องกันสารละลายเอนไซม์เข้าไป 3) การซึมโดยอาศัยสุญญากาศ (vacuum-assisted infusion) เช่นเดียวกับวิธีการซึมโดยอาศัยความดัน วิธีนี้ทำได้ผลดีสำหรับเนื้อเยื่อที่มีที่ว่างภายในจำนวนมาก ภายใต้สุญญากาศในขณะที่ตัวอย่างแช่อยู่ในสารละลายเอนไซม์อากาศจะถูกดึงออกไปจากเนื้อเยื่อผักผลไม้ เมื่อกลับเข้าสู่ความดันบรรยากาศ สารละลายเอนไซม์จะเข้าสู่ที่ว่างในเนื้อเยื่อ ข้อดีของวิธีการนี้คือสุญญากาศทำให้อากาศภายในออกไปหมดดังนั้นสารละลายเอนไซม์จึงสามารถอยู่ในเนื้อเยื่อภายหลัง infusion (Baker and Wicker 1996)

แม้ว่าประโยชน์จาก PME ทั้งภายในและภายนอกเป็นที่ยอมรับแน่ชัด แต่ตัวยังเอนไซม์ PME (pectinmethylesterase inhibitor) ที่พบในผักและผลไม้บางชนิดมีผลทำให้ประสิทธิภาพของ PME ลดลง ดังนั้นจึงมีแนวโน้มการใช้ PME จากจุลินทรีย์มากกว่า PME จากพืช เพราะนอกจากจะหาซื้อได้ง่ายยังมีประโยชน์ในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสมากกว่า นอกจากนี้ยังไม่ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งเอนไซม์ PME ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ PME จากพืช (Sila *et al.* 2008)

Table 1 และ 2 แสดงตัวอย่างสมการที่เหมาะสมที่ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่มียางในเอกสารวิชาการ

- ไฮโดรคอลลอยด์ (Hydrocolloids)

การชิมของสารก่อเจล (gelling agents) ในอาหารที่มาจากพืชช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสโดยการสร้างสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์ในรูปพูนหรือช่วยเติมเต็มโครงข่ายภายในผนังเซลล์ หรือการสร้างพันธะระหว่างไฮโดรคอลลอยด์ที่เติมลงไปกับองค์ประกอบในผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามเจลที่เข้าประหว่งเซลล์จะสามารถช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสได้ต่อเมื่อโครงสร้างมีความเป็นรูปพูนสูงและการตุบชิมตัวละลายมีปริมาณสูงโดยเฉพาะเมื่อการถายเทมวลสารถูกจำกัดโดยความหนืดที่สูงของสารละลายเจล (Sila *et al.* 2008)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้คือการใช้กัมแซนแทน (xanthan gum) ในเห็ดกระดุม (button mushroom หรือ *Agaricus bisporus*) ก่อนขั้นตอนการลวกและบรรจุกระป๋องพบว่าช่วยปรับปรุงน้ำหนักสุทธิและรสชาติของผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้เป็นอย่างดี (Gormley and Walshe 1986) Mattinge *et al.* (1999) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารไฮโดรคอลลอยด์ เช่น เจลาติน (gelatin) เพกทิน (pectin) อัลจิเนต (alginate) และสตาร์ช (starch) โดยใช้สบูญจากพืชช่วยผลักดันสารเหล่านี้เข้าไปในเนื้อเยื่อให้ได้ดีกับผลิตภัณฑ์แอปเปิ้ลหั่นชิ้นแช่เยือกแข็งได้

ค. การใช้ความดันสูงก่อนการแปรรูป

เทคนิคใหม่ที่เกิดขึ้นเพื่อถนอมอาหารจากพืชให้มีความคงตัวขึ้นได้แก่การแปรรูปโดยใช้ความดันสูง (high-pressure, HP) การใช้ความร้อนสูงช่วยจัดผลกระทบบที่รุนแรงต่อคุณภาพเมื่อใช้ความร้อนในการแปรรูป ในแง่การทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการรักษาเนื้อสัมผัสพบว่า HP แรงการทำงานของ PME อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ความดันในช่วงที่เหมาะสม (Sila *et al.* 2008)

ตัวอย่างเช่นแตรอทที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้น 9 เท่า

เมื่อใช้ความดันสูง (400 MPa, 60°C, 15min) และแซนเทลเทียม (0.5% w/v) เมื่อเทียบกับการใช้การลวกที่อุณหภูมิต่ำแบบดั้งเดิมที่ 90°C, 4min (Sila *et al.* 2004; 2005)

เนื้อสัมผัสที่แข็งขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากเอกทิวติของ PME เมื่อใช้ความดันสูง PME ถูกปลดปล่อยออกมาแล้วสัมผัสกับซับสเตรตซึ่งก็คือเพกทินที่มีหมู่คาร์บอกซิลถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยเมทานอลในสัดส่วนสูงนำไปสู่ปฏิกิริยาการแยกสลายหมู่เมทิล เพกทินที่มีหมู่เมทิลน้อยสามารถก่อตัวสร้างโครงข่ายกับไฮออนที่มีเวเลนซีเท่ากับสองเป็นผลต่อการเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ความดันสูงยังลดปฏิกิริยาทางเคมี เช่น β -elimination ระหว่างการใช้ความดันสูงและอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่นอนที่อธิบายการปรับปรุงเนื้อสัมผัสเมื่อใช้ความดันสูงและอุณหภูมิสูงที่ยังคงต้องการศึกษาวิจัยต่อไป (Oey *et al.* 2008)

ง. การดัดแปลงทางพันธุกรรมของเมทริกซ์พอลิเมอร์

ปัจจุบันการดัดแปลงทางพันธุกรรมของเมทริกซ์พอลิเมอร์นั้นเน้นหนักการดัดแปลงเอนไซม์ในผนังเซลล์ การดัดแปลงโพลีแซคคาไรด์อยู่บนหลักการควบคุมยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์หรือที่ควบคุมองค์ประกอบในระบบการสังเคราะห์ (genes encoding biosynthetic enzymes หรือ components of synthase complexes) การควบคุมแยกวิถีของเอนไซม์ทำได้โดยการบวนการที่ทำให้ยีนไม่สามารถทำงานได้ (gene silencing) และการคัดเลือกเอายีนที่มีอยู่ออกทิ้งหรือทำให้ยีนนั้นใช้งานไม่ได้ (selective knockouts) ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การดัดแปลงเพกตินของหัวมันฝรั่ง (มี galactan ปริมาณมาก) ทำโดยการดัดแปลงการแสดงออก (expressing) ของเอนไซม์ไกลโคซิลเลสลาย rhamnogalacturonan I ซึ่งลดระดับของ arabinan และ galactan ในหัวมันฝรั่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ ในมะเขือเทศการละลายของเพกตินในผนังเซลล์ของพืชที่ดัดแปลงพันธุกรรม(transgenic plant) สามารถบังคับได้โดยการควบคุมการย่อยสลายของ PME และ endo-PG การรักษาน้ำเนื้อสัมผัสให้คงที่โดยการทำได้โดยการเอายีนของเอนไซม์ที่มีอยู่ออกทิ้งหรือทำให้ยีนนั้นใช้งานไม่ได้หลายตัวในคราวเดียวโดยเฉพาะเอนไซม์ที่มีเป้าหมายแตกต่างกันในแต่ละองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Sila *et al.* 2008)

จ. การให้ธาตุที่ช่วยเพิ่มความแข็งแรงระหว่างชั้นตอนการปลูก

วิธีการในอุตสาหกรรมที่ใช้ช่วยในการรักษาเนื้อสัมผัสนั้นอาศัยหลักการทำงานของแคลเซียมร่วมกับเอนไซม์ PME ซึ่งมีข้อจำกัดหลายด้านโดยเฉพาะการควบคุมความสม่ำเสมอในการแพร่กระจายของแคลเซียมในเนื้อเยื่อพืชซึ่งควบคุมได้ยาก ทำให้วิธีการนี้ยังไม่มีประสิทธิภาพสมบูรณ์ นอกจากนี้ประสิทธิภาพของวิธีนี้ในผักผลไม้ที่มีลักษณะทางกายภาพต่างกันมีความแตกต่างกันจึงมีแนวคิดในการใช้ธาตุอาหารเพิ่มความแข็งแรงแก่เนื้อเยื่อพืชได้แก่ซิลิกอนและแคลเซียมเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผักผลไม้ตั้งแต่ระหว่างการปลูกโดยหวังว่าจะส่งผลดีด้านเนื้อสัมผัสต่อเนื่องมาแปรรูป อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ช่วยลดขั้นตอนในการผลิตและช่วยประหยัดเวลาพลังงานและกำลังคน และยังช่วยลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในผลิตภัณฑ์แปรรูป

ธาตุอาหารที่พบว่ามีความสำคัญต่อความแข็งแรงหรือเนื้อสัมผัสของเนื้อเยื่อพืชนอกจากแคลเซียม ได้แก่ซิลิกอน (Si) ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่มีอยู่มากมายเป็นพื้นผิวโลก แต่ไม่จัดเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชเหมือนแคลเซียม แต่ก็มีหลักฐานมากมายที่ระบุว่าพืชที่ได้รับซิลิกอนมากกว่าปกติให้ผลดีต่อการเจริญ การดูดซึมธาตุอาหาร ความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ความต้านทานต่อแมลงศัตรูและเชื้อรา (ถินมนั่นต์ 2538)

ซิลิกอน (^{14}Si) เป็นธาตุที่มีมากเป็นอันดับสองของผิวโลก น้ำดิน (soil water หรือ soil solution) มีซิลิกอนส่วนใหญ่อยู่ในรูป silicic acid (H_4SiO_4) ซึ่งเป็นรูปที่พืชนำไปใช้ได้ มีความเข้มข้นประมาณ 0.1-0.6 mM พอๆกับโปแทสเซียม แคลเซียม และธาตุอาหารหลักของพืชอื่นๆ

ซิลิโคนถูกดูดซึมง่ายโดยพืช ความเข้มข้นแตกต่างกันไปจาก 1% ถึง 10% ของน้ำหนักแห้งหรือมากกว่านั้นพืชบางชนิด (Epstein 1994) ซิลิโคนถูกดูดซึมโดยราก ส่งผ่านไปทั่วพืชแล้วสะสมในรูป amorphous silica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ในผนังเซลล์ ช่องระหว่างเซลล์ (cell lumens) ส่วนที่เชื่อมระหว่างเซลล์ (intercellular spaces) (Jones and Milne 1963; Lux *et al.* 2003, 2004) Kim *et al.* (2002) ใช้เทคนิค electron microscopy และ x-ray microanalysis ในการศึกษาตำแหน่งและปริมาณการสะสมของซิลิโคนในข้าวที่ปลูกในระบบไถดิน (hydroponic) ที่มีการเติมซิลิโคนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป พบว่าซิลิโคนที่เติมลงไปสะสมในผนังเซลล์และช่วยส่งเสริมการต้านทานการทำลายของตัวอ่อนศัตรูพืช ยิ่งความเข้มข้นของซิลิโคนสูงยิ่งต้านทานการทำลายได้สูง ซิลิโคนมักพบได้ cuticle ใน epidermal ในผนังเซลล์ ซิลิโคนที่เติมลงไปส่วนใหญ่สะสมในผนังเซลล์ middle lamella และช่องระหว่างเซลล์ (intercellular spaces)

งานวิจัยในประเทศไทยก็มีการศึกษาการใช้ประโยชน์ของซิลิโคนในการป้องกันศัตรูพืชโดยเฉพาะในข้าว Khan and Chaiyawat (2533) พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับของซิลิโคนในเนื้อเยื่อของข้าว ขึ้นน้ำ ช่วยลดจำนวนและเพิ่มเวลาการจะทำลายโดยตัวอ่อนของหนอนกอสีคราม โดยซิลิโคนที่เพิ่มขึ้น ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของลำต้นข้าว นอกจากนี้ บัญชรรมและแสนสุข (2536) ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของ ปริมาณซิลิโคนช่วยต้านทานโรคราไหมในข้าวขึ้นน้ำ ซิลิโคนที่เพิ่มขึ้นยังช่วยให้ข้าวมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น (ประโยชน์และคณะ 2537) การศึกษาของ Shahjahan และ Talukder (2536) พบการลดลงของจำนวนประชากรของศัตรูของข้าวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว ตัวห้ำ แมงมุม แมลงเต่าทอง ในทุ่งข้าวที่ปลูก โดยมีซิลิโคนสูง การใช้ซิลิโคนที่มีความเข้มข้นเหมาะสมยังช่วยควบคุมเชื้อราในการปลูกแตงยุโรปใน ระบบไม่ใช้ดินในโรงเรือน ช่วยเพิ่มผลผลิต ลดการใช้สารเคมี และสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์ (ถนิมนันต์และวารวณ 2541)

กระบวนการที่เป็นสาเหตุให้ทำให้ซิลิโคนช่วยยับยั้งการพัฒนาของโรคพืชและป้องกันศัตรูพืชนั้นคาดว่าเกิดจากการสะสมและการเกิด polymerization ของ silicic acid ในผนังเซลล์ ซึ่งเป็นเกาะก้างทางกายภาพ ป้องกันการจะทำลายของราศัตรูพืช ตัวหนอน และแมลง (Kim *et al.* 2002) หลักฐานสนับสนุนการสะสมของซิลิโคนในผนังเซลล์ของพืชในพืชที่ปลูกและเพาะในสภาวะที่มีซิลิโคนสูงมีกล่าวไว้ในหลายงานวิจัย (Cherif *et al.* 1992, Kim *et al.* 2002, Samuels *et al.* 1994)

หินแร่ภูเขาไฟบางชนิดมีซิลิโคนที่ละลายน้ำได้เป็นปริมาณที่พบมากกว่าในดินปกติ พบว่าผักที่ปลูกในเขตภูเขาไฟเก่าของญี่ปุ่นโดยทั่วไปมีลักษณะแข็งกรอบอร่อย รสการขมในตู้เย็นได้นานไม่ยุบ ง่าย ทั้งนี้เนื่องมาจากอิทธิพลของซิลิโคน (ตีพร้อม 2541) มีการประยุกต์ใช้ซิลิโคนในรูปที่ละลายน้ำกับพืชหลายชนิด ซิลิโคนในรูปนี้ช่วยให้พืชดูด ซิลิโคนที่ละลายน้ำนั้นขึ้นไปพร้อมกับการดูดน้ำของพืชผ่านทางท่อลำเลียงกระจายไปทั่วต้นพืช เมื่อน้ำระเหยออกทางผิวของพืชและผนังเซลล์แต่ซิลิก้าระเหยไม่ได้จึงสะสมในพืชมากขึ้นโดยเฉพาะในผนังเซลล์พบว่าทำให้พืชแข็งแรงทน

ต่อโรค แผลลง ไร เพลี้ย และหนอนอนมากขึ้น การมีซิลิกาที่พืชผักมากขึ้นทำให้พืชผักเช่น ผักกาด คะน้า กวางตุ้ง ถั่วฝักยาว ต้นขาย มีความแข็งแรงทนทานขึ้น เก็บรอการขายได้นานขึ้น และมีรอย ช้ำน้อย (ตีพร้อม 2541)

แหล่งของซิลิคอนใต้แก่ ซีโอไลท์ (Zeolite) ไครน็อฟติโลไลท์ (Clinoptilolite) ภูเขาไฟ (Pumice) และสเมคไทต์ (Smectite) ซึ่งมีซิลิคอนอยู่ 71.6, 70.3, 68.7 และ 60.1% ตามลำดับ (ประเวศ 2544) ส่วนประกอบของธาตุต่างๆใน ซีโอไลท์ ไครน็อฟติโลไลท์ ภูเขาไฟ และ สเมคไทต์ แสดงไว้ใน Table 1.1

แหล่งของหินแร่ที่มีซิลิคอนสูงในประเทศไทยคือแถบเขากระโดง จังหวัดบุรีรัมย์ และเทือก ภูเขา ไฟ เกาชนาดใหญ่ อายุ 22 ล้านปีที่จังหวัดลพบุรี (ตีพร้อม 2541)

ตีพร้อม (2541) ได้บรรยายในหนังสือพืชผักปลอดสารพิษจากภูเขาไฟถึงวิธีการใช้หินแร่ภูเขา ไฟ ชนิดที่มีซิลิคอนที่ละลายน้ำได้ เช่น ซีโอไลท์ ไครน็อฟติโลไลท์ ภูเขาไฟ และสเมคไทต์ในการเพิ่ม ปริมาณ ซิลิคอนในเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชแข็งแรง ต้านทานต่อเพลี้ย หนอน ไร รา สัตว์เคี้ยวเอื้อง ช่วย ปรับปรุง คุณภาพของพืชผักให้กรอบ อร่อย เก็บได้นาน ทนทานต่อการขนส่ง ไม่ช้ำง่าย เก็บใน ตู้เย็นได้นาน อีกทั้งยังเป็นการลดสารพิษกำจัดศัตรูพืช และลดสารพิษตกค้างที่ติดมากับผัก ปริมาณ การใช้ภูเขาไฟจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช พืชผักเล็กๆ เช่น ผักกินใบ ใช้ในปริมาณน้อยก็จะ เห็นผล ส่วนพืชต้น ใหญ่ เช่น มะขามเทศ ชมพู มะม่วง ต้องใช้เวลานานและ ปริมาณมากจึงจะเห็น ผล

จากข้อมูลข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการประยุกต์ใช้ซิลิคอนที่พืชนำไปใช้ในการ เพิ่ม ปริมาณซิลิคอนในเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชแข็งแรง ปรับปรุงคุณภาพของผลผลิตและวัตถุดิบที่จะ นำมาแปรรูปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่สูง การแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรโดยใช้ เทคโนโลยี เช่น การแปรรูปเล็กน้อย (minimally processing) การแปรรูปโดยใช้ความร้อน (thermal processing) เช่น ผักผลไม้บรรจุ กระป๋อง หรือขวดแก้ว การแปรรูปแบบแช่เยือกแข็ง (freezing processing) เหล่านี้ล้วนแล้วแต่ต้องใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพสูง เพราะต้องผ่านกระบวนการแปรรูปที่ ทำให้เนื้อเยื่อเสียหายนำไปสู่การสูญเสียเนื้อสัมผัสโดยตรง การที่พืชมีเนื้อเยื่อที่แข็งแรง ตั้งแต่เริ่มต้นยังอาจทดแทนหรือส่งเสริมประสิทธิภาพของการใช้สารเพิ่มความกรอบในขั้นตอนการ แปรรูปและช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีในการผลิต นอกจากนี้การที่เนื้อเยื่อพืชที่แข็งแรงยังอาจ เป็นการป้องกันปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างกระบวนการแปรรูป เช่น ปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่เกิด จากเอนไซม์ โดยไม่ต้องใช้สารเคมี Chikthimma *et al.* (2006) พบว่าการใช้สารละลายแคลเซียม คลอไรด์เข้มข้น 0.3% หรือ การใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3% ร่วมกับสารละลาย โซโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 0.75% ในน้ำแช่เห็ด ช่วยปรับปรุงสีของเห็ดกระดุมให้ขาวขึ้น ลด ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน และนอกจากนี้ยังช่วยลดการเกิดสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษาซึ่งช่วย ยืดอายุการเก็บรักษาองเห็ด การใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำแช่เห็ดกระดุมทำให้ปริมาณ

แคลเซียมในเห็ดเพิ่มขึ้นและพบความสัมพันธ์กับความยาวเริ่มต้นของเห็ด (Simons and Beelman 1996) การลดลงของการเกิดสปีดอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณแคลเซียมทำให้เซลล์เมมเบรนของแอสคูลาแข็งขึ้นซึ่งจะไปลดโอกาสที่เอนไซม์ที่ทำให้เกิดสปีดตาลเกิดปฏิกิริยากับสารตั้งต้นของมัน การลดลงของการเกิดสปีดตาลอาจเป็นผลมาจากผลของแคลเซียมที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสปีดตาลด้วยก็ได้

เห็ดเป็นอาหารที่มีคุณค่าสูงและเป็นนิยมนบริโภคมาเป็นเวลาช้านาน อีกทั้งยังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งเนื่องจากการเพาะเห็ดให้ผลตอบแทนสูงในระยะเวลาสั้น จัดเป็นพืชหลายอย่าง เช่น เห็ดบรอกโคลีหรือขวอดแก้ว ในรูปทั้งเห็ดสดและเห็ดดองเค็ม แหยมเห็ด เห็ดสวรรค์หรือเห็ดหยอง เห็ดแดดเดียว ลูกชิ้นเห็ด ฯลฯ ในการเพาะเห็ดนิยมผสมยิบซัม (แคลเซียมซัลเฟต) หรือปูนขาวในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของดอกเห็ดและเพิ่มความแข็งแรงแก่เส้นใยเห็ด ถึงแม้โครงสร้างของเห็ดจะไม่ซับซ้อนเท่าโครงสร้างของพืชแต่เนื้อเยื่อของเห็ดประกอบจากเซลล์ที่มีผนังเซลล์เหมือนพืชทั่วไป และการเพาะเห็ดให้ผลผลิตในระยะเวลาสั้น และสามารถผลิตปริมาณมากพอสำหรับการแปรรูป ดังนั้นเห็ดจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษาอิทธิพลของใช้ธาตุอาหารเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืชได้แก่ซิลิโคนและแคลเซียมในการเพาะปลูกต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ผักแปรรูปชนิดอื่นๆได้นอนาคต

Table 1.1 สมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของซีโอไลท์ ไครน็อพติไลต์ ภูเมท์ และสเมกไทต์

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์			
	ซิลิเกต	โครน็อพติไลต์	ภูเมท์	สเมกไทต์
ฟิเอร์	7.31	7.63	7.92	6.72
ซิลิคอน	71.6	70.3	68.7	68.1
อลูมิเนียมออกไซด์	11.9	12.3	13.6	14.7
โซเดียมออกไซด์	0.53	0.47	2.18	2.13
แมกนีเซียมออกไซด์	1.03	0.93	0.46	0.66
โพแทสเซียมออกไซด์	2.65	2.81	4.69	4.40
แคลเซียมออกไซด์	3.01	3.50	1.02	10.2

ที่มา: ประเวศ (2544)

บทที่ 2 วัสดุและวิธีการ

2.1 แหล่งของซิลิคอน แคลเซียมและซิลิคอน-แคลเซียม

ภูเฒ่า (Pumice) เป็นแหล่งของซิลิคอนที่ใช้ในทางเกษตรกรรมและผลิตในประเทศไทย ภูเฒ่าเป็นหินภูเขาไฟที่มีซิลิคอนในปริมาณสูงมีลักษณะเป็นผงสีขาวอ่อน ภูเฒ่าประกอบด้วย 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)

ยิปซัมหรือ Gypsum ($CaSO_4$) จะถูกใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมในการทดลอง ยิปซัมที่ใช้เป็นยิปซัมที่ผลิตในประเทศไทยที่ใช้ในงานเกษตรกรรม มีความบริสุทธิ์ 97% ประกอบด้วย 23.3% calcium และ 17.8% sulfur (SO_4)

ภูเฒ่าซัลเฟต (Pumice sulfate) จะถูกใช้เป็นแหล่งของซิลิคอน-แคลเซียมในการทดลอง ภูเฒ่าซัลเฟตที่ผลิตในประเทศไทยและใช้ในงานเกษตรกรรม 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 การเตรียมวัสดุและการผลิตเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*)

เชื้อเห็ด *ภูเฒ่า* เป็นเห็ดในตระกูลเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*) ซึ่งมีดอกสีเทาเข้มกว่าเห็ดนางฟ้าชนิดอื่น เชื้อเห็ด *ภูเฒ่า* เบอร์ 3 บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองอยู่ในรูปเส้นใยในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) ได้มาจากกลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุพืชและจุลินทรีย์สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นำแม่เชื้อที่ได้มาต่อเชื้อในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) หลังจากบ่มเส้นใยที่ $25^{\circ}C$ เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์หรือเมื่อเส้นใยสีขาวเจริญเต็มหน้าวุ้นใน Petri dishes จึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 cm^2 ใส่ลงในขวดบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ $121^{\circ}C$ เป็นเวลา 15min เพื่อทำเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่างที่ $25^{\circ}C$ เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จึงนำมาเพาะไว้ในวัสดุเพาะเลี้ยงก้อนเชื้อเห็ด

สูตรวัสดุเพาะมาตรฐานสำหรับเห็ดนางฟ้าประกอบด้วย

ขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง 60%

รำละเอียด 6%

คัลเซียหรือ $MgSO_4$ (industrial grade) 0.12%

ปูนขาวหรือ $CaCO_3$ (industrial grade) 0.6%

ผสมน้ำให้มีความชื้น 60%

สูตรวัสดุเพาะต่างๆที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยสูตรวัสดุเพาะมาตรฐานที่มีการเติมยิบซัม 5 และ 10% หรือแกลบ 10, 20, 30% หรือแกลบ 10, 20 และ 30% ปริมาณยิบซัม แกลบ และแกลบที่ซัลเฟต คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของขี้เลื่อยไม้ยางพาราแห้ง **Table 2.1** แสดงสูตรต่างๆของวัสดุเพาะ

บรรจุวัสดุเพาะที่กลุ่มผสมเข้ากันดีแล้วลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 25x35cm นำหนักของวัสดุเพาะในแต่ละถุงเป็น 0.9kg กดให้แน่นตึงสูงประมาณ 2/3 ของถุง รวบปากถุงบีบอากาศออกสวมคอพลาสติกแล้วพับปากถุงพาดลงมา อุดด้วยลวดสี่เหลี่ยมด้วยกระดาษแล้วรัดยางให้แน่นนำไปึ่งฆ่าเชื้อในถังน้ำอุณหภูมิ 90-100°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2h ทิ้งไว้ให้ถุงเย็น นำถุงวัสดุเพาะมาใส่เชื้อจากหัวเชื้อเห็ดที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างถุงละประมาณ 10-15 เมล็ด (โดยเขย่าเมล็ดข้าวฟ่างให้กระจายออก) โดยปิดและเปิดจากลวดสี่เหลี่ยม โดยปฏิบัติในที่สะอาดมืดชื้นไม่มีลมโกรก นำถุงวัสดุเพาะที่ใส่เชื้อแล้ววางในห้องบ่มเส้นใยที่ควบคุมอุณหภูมิ 24-28°C เป็นระยะเวลาประมาณ 3-4 อาทิตย์จนเส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อ จึงนำเข้าเปิดดอกในโรงเรือน เปิดดอก เมื่อเส้นใยเริ่มรวมตัวกันจึงถอดลวดและขอขวดออก รักษาความชื้นที่ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-90% อุณหภูมิ 25-32°C ในโรงเรือนเปิดดอก การเก็บเกี่ยวผลผลิตทำเมื่อดอกบานเต็มทีแต่ขอบหมากยังไม่บานย่อยในแต่ละสัปดาห์ก่อนเชื้ออย่างน้อย 25 ก่อนการปฏิบัติต่อก่อนเชื้อทุกครั้งก่อนและทุกสัปดาห์หมั่นกันหมดและเปิดดอกในโรงเรือนเดียวกัน การคำนวณ Biological efficiency (BE) จำนวนโดย

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

2.3 การวัดปริมาณซิลิคอนในดอกเห็ด

ดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวจากวัสดุเพาะแต่ละสูตร (อย่างน้อยสูตรละ 1kg) ถูกแยกเป็นหลอดดอก และก้านดอก อบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12h นำครึ่งและก้านที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 20 mesh นำตัวอย่างครึ่งและก้านบดมา 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) + MgSO ₄ (0.12 kg) + CaCO ₃ (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)

ปริมาณทิลลิกอนทำได้โดยการเตรียมสารละลาย heteropoly blue compound โดยการทำปฏิกิริยาของทิลลิกอนในตัวอย่อย่างที่่ย่อยกับ 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 ทิลลิกอนมาตรฐานเตรียมจาก silicon atomic absorption standard solution เข้มข้น 100ppm ละลายใน 1.9% NaOH (Sigma) ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง

2.4 การวัดปริมาณแคลเซียมในดอกเห็ด

นำตัวอย่างครีบบและก้านที่อบแห้ง บดละเอียดตามข้อ 2.3 มา wet-digested โดยใช้ HNO₃ และ HClO₄ วัดปริมาณแคลเซียมโดยใช้ atomic absorption spectrophotometry (GBC model Avanta PM, Australia) ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง

2.5 การวัดเนื้อสัมผัส

การวัดเนื้อสัมผัสด้านความแน่นเนื้อ (Firmness) โดยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron texture machine) โดยสัมผัสอย่างเห็ดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบบ 7cm ตัดตัวอย่างครีบบดอกเห็ดเป็นชิ้นขนาด 2 x 1cm ที่ตำแหน่งเดียวกันทุกครีบบ ส่วนก้านดอกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm แล้วตัดให้ยาวประมาณ 3cm วัดเนื้อสัมผัสในรูปแบบค่า shear values โดยใช้ Universal Testing Machine (4411, Instron Laboratory Inc., USA) ที่ติดกับ Warner-Bratzler shear cell ค่าเนื้อสัมผัสที่วัดคือค่าแรงสูงสุดที่ใช้ในการตัดชิ้นครีบบและก้านดอกเห็ด ค่าความแน่นเนื้อได้จากค่าเฉลี่ยที่วัดจากชิ้นตัวอย่างอย่างน้อย 10 ชิ้น

2.6 Solid content

สัมผัสตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบบ 7cm และก้านดอกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ซึ่งตัวอย่างที่หนักแล้วมา 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) (ัดแปลงจาก Redmond et al. 2004) สัมผัสตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบบ 7cm และ

กำหนดอกเก็ตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1cm แล้วหั่นเป็นชิ้นขนาด 0.5x0.5cm ซึ่งตัวอย่างที่หั่นแล้วประมาณ 5g ใส่ใน paper filter thimble แห้งเย็นที่ -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

$$\text{drip loss (\%)} = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100 \quad (2.2)$$

W_i

W_f คือ น้ำหนักเริ่มต้น, W_f คือ น้ำหนักสุดท้าย วัดซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

2.8 การตุ๋นซีสมแคลเซียมและซิลิคอนของเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลว

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

เชื้อเห็ดภูฏานเบอร์ 3 บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลองอยู่ในรูปเส้นใยในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) ได้มาจากกลุ่มวิจัยและพัฒนาทางเชื้อพืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นำแม่เชื้อที่ได้มาต่อเชื้อในอาหารวุ้น (Potato dextrose agar) หลังจากบ่มเส้นใยที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์หรือเมื่อเส้นใยสีขาวเจริญเต็มหน้าวุ้นใน Petri dishes จึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1cm² ถ่ายลงบนอาหารเหลวที่บรรจุใน flask ขนาด 50ml หลายๆขวด บ่มที่ 25°C เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์หรือจนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเหลว ตัวอย่างความอุดมคือเส้นใยที่เจริญบนอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมสารละลายซิลิคอนและ/หรือแคลเซียม การแยกเส้นใยออกจากอาหารเหลวทำโดยการกรองอาหารเหลวออกจากเส้นใยผ่านกระดาษกรอง แล้วล้างเส้นใยที่แยกออกมาหลายๆครั้งด้วย de-ionized water

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

2.9 Scanning electron microscope (SEM)

ศึกษาโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อเห็ดด้วย Scanning Electron Microscope (Leo1455VP) การเตรียมชิ้นตัวอย่างสำหรับ SEM ตัดแปลงจาก Ko *et al.* (2007) และ Zivanovic *et al.* (2000) fixed ตัวอย่างให้หีสดและให้ดกรบ้อง (ขึ้นดีขวงวขงท้งก้านแลละครีบดอก) ใน modified Karnovsky's fixative ซึ่งประกอบด้วย 2% glutaraldehyde แลละ 2% paraformaldehyde ใน 0.05M Cacodylate buffer ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 24 h ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างออกจาก fixative แลละล้าง 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์ ครั้งละ 5min นำชิ้นตัวอย่างมาทำให้แห้งด้วยการบรแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ที่ควมเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 90% ที่ควมเข้มข้นละ 5min แลละตามด้วยการแช่สองครั้งใน absolute ethanol ครั้งละ 5min นำชิ้นตัวอย่างใส่ในตะกร้าโลหะใน critical point dryer เพื่อทำ critical point drying นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งสนิทแล้วติดบน aluminum stubs แลแล้ว sputter-coated ด้วยทอง นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ส่องกล้องแลถ่ายภาพด้วย SEM

2.10 การแปรรูปแบบใช้ความร้อน

นำตัวอย่างเห็ดสดมาแปรรูปเป็นเห็ดบรรจุกระป๋องหรือขวดแก้ว สุ่มตัวอย่างเห็ดสดนางฟ้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบบ 7.30 ± 2.26cm ตัดก้านดอกลงให้เหลือยาวประมาณ 3cm ลวกเห็ดในน้ำเดือดเป็นเวลาประมาณ 30s ก่อนบรรจุ (ประมาณ 200g) ลงในขวดปากกว้างขนาด 12 ounces แลแล้วเติมสารละลาย 2% NaCl แลละ 0.05% citric acid ปิดปากขวดแลแล้วฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15min ในหม้ออึ่งนึ่งควมดัน ทำให้น้เย็นแลแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนการตรวจสอบคุณภาพในด้านเนื้อสัมผัสตามข้อ 2.5 ค่า weight gained แลละ grade losses

การวัด drain weight ของเห็ดบรรจุกระป๋องทำตามวิธีมาตรฐานคือชั่งน้ำหนักหลังจาก drain บนภาตเจาะรูเป็นเวลา 2min ส่วนการวัดขนาดครีบบดอกลงทำโดยใช้ vernier caliper นำค่า drain weight แลละขนาดครีบบดอกลงทั้งให้หีสดแลละให้ดแปรรูปมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ weight gained แลละเปอร์เซ็นต์ grade losses ดังสมการ 2.3 แลละ 2.4

$$\text{Weight gained (\%)} = \frac{(w_d - w_i)}{w_i} \times 100 \quad (2.3)$$

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

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

เมื่อ cd_i คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของศรีดอกของเห็ดสดก่อนการแปรรูปด้วยความร้อน และ cd_d คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของศรีดอกของเห็ดบรรจุกระป๋อง ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการวัดอย่างน้อย 5 ซ้ำ

2.11 การแปรรูปแบบแช่เยือกแข็ง

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

การตรวจสอบคุณภาพ

- เนื้อสัมผัสหลังการละลายน้ำแช่แข็งตามวิธีการในข้อ 2.5
- เปอร์เซ็นน้ำที่สูญเสียหลังการละลายน้ำแช่แข็ง (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

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 Supplement compositions

แร่ธาตุเช่นโพแทสเซียม (potassium) แคลเซียม (calcium) เหล็ก (iron) ทองแดง (copper) แมงกานีส (manganese) สังกะสี (zinc) โมลิบดีนัม (molybdenum) มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Royse and Sanchez-Vazquez 2003; Yildiz et al. 1998; Özgelik and Pekşen 2007) นอกเหนือจากองค์ประกอบหลักคือแคลเซียมและซิลิคอน ภูไมท์และภูไมท์ซิลเฟตประกอบด้วยแร่ธาตุอื่นๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในปริมาณเล็กน้อย เช่น ภูไมท์ประกอบด้วย แมงกานีส 0.46% โพแทสเซียม 4.69% ภูไมท์ซิลเฟต ประกอบด้วย แมงกานีส 0.01% เหล็ก 0.01% สังกะสี 0.0005%

ดังนั้น Mg, K, Fe และ Zn ในภูไมท์และภูไมท์ซิลเฟตไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตเห็ดนางฟ้า เนื่องจากมีอยู่ในปริมาณน้อยมาก ไม่มีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ K และปริมาณผลผลิตของ *Pleurotus* spp. ในการศึกษาของเห็ดหอม (shiitake mushrooms) พบว่าปริมาณ K ในวัสดุเพาะไมมีความสัมพันธ์กับปริมาณผลผลิตหรือค่า BE (Özgelik and Pekşen 2007) พบว่า K เป็นแร่ธาตุที่พบมากที่สุดใน *P. ostreatus* var. *saligunus* ปริมาณ K ที่พบมากในเนื้อเยื่อเนื่องจากการดูดซึมมาจาก K ที่สะสมในวัสดุเพาะอย่างจำกัดไม่มีรายงานว่า K มีผลต่อการปรับปรุงผลผลิต

แม้ว่าซิลเฟอร์มีปริมาณมากพอสมควรในภูไมท์ซิลเฟต (7.0% sulfur) และยิบซัม (17.0% sulfur) แต่จากการศึกษาไม่พบว่าซิลเฟอร์มีผลต่อการเห็ดนางฟ้า Yildiz et al. (1998) รายงานว่าไม่พบซิลเฟอร์ในเนื้อเยื่อของ *P. ostreatus* var. *saligunus* ผู้วิจัยระบุว่าซิลเฟอร์มีคุณสมบัติที่เห็นเท่านั้น

จากข้อมูลข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าอิทธิพลของภูไมท์ ภูไมท์ซิลเฟต และยิบซัมมาจากอิทธิพลของซิลิคอนและ/หรือแคลเซียมซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก

3.2 Spawn run time, time periods of fruit body formation, yield and BE

การเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซิลเฟต ในวัสดุเพาะสำหรับการผลิต *P. ostreatus* ไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเดินเส้นใย (time periods of spawn runnig หรือ mycelia development) (Table 3.1) อาจเนื่องมาจากอัตราส่วน C:N ของวัสดุเพาะในแต่ละสูตรไม่แตกต่างกัน ระยะเวลาใน

การเดินเส้นใยที่แตกต่างกันมีสาเหตุเนื่องจากชนิดของเห็ด (genotype) และอัตราส่วน C:N ของวัสดุเพาะ วัสดุจากพืชที่มีอัตราส่วน C:N ต่ำย่อยสลายเร็วกว่าพวกที่มีอัตราส่วน C:N สูง ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าการขยายตัวของเส้นใยสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่นำไปใช้ได้ (Özcelik and PekŞen 2007)

ระยะเวลาในการจับปมดอก (Time periods of fruit body formation) ลดลงประมาณ 4-5 วัน เมื่อมีการเติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟตในวัสดุเพาะ สำหรับแต่ละทรีตเมนต์ *P. ostreatus* ใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ในการจับปมดอกหลังจากเส้นใยเต็มวัสดุเพาะ (**Table 3.1**) ผลการทดลองของเราสอดคล้องกับรายงานของ Tan (1981) ซึ่งรายงานว่า *P. ostreatus* ที่เพาะบน cotton waste ใช้เวลา 2-3 สัปดาห์ในการจับปมดอกหลังจากเส้นใยเต็มวัสดุเพาะ การที่ระยะเวลาในการจับปมดอกเร็วขึ้นบ่งชี้ถึงเส้นใยที่หนาแน่นขึ้นเมื่อมีการเติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟต ในวัสดุเพาะ ทำให้เส้นใยจับปมดอกและเกิดดอกได้เร็วขึ้น (Royse et al. 2004).

สำหรับแต่ละทรีตเมนต์ผลผลิตเห็ดเห็ดรุ่นแรกมีปริมาณสูงสุดและผลผลิตลดลงในรุ่นที่สองและสาม มีรายงานการลดลงของผลผลิตในรุ่นที่สองของการผลิต *P. ostreatus* โดย Wang et al. (2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานในการผลิต *P. sajor-caju* โดย Zhang et al. (2002) และในเห็ดนางฟ้าซึ่งรายงานโดย Murugesan et al. (1995) ปริมาณผลผลิตทั้งหมดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อมีการเติมยิบซัมและภูเขาไมท์ซัลเฟตลงในวัสดุเพาะในระดับความเข้มข้น 10% and 20% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเติมภูเขาไมท์ลงในวัสดุเพาะในระดับมากถึง 20% และ 30% ให้ปริมาณผลผลิตทั้งหมดไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม

BES ที่คำนวณจากผลผลิตทางสามรุ่นเป็นไปในทิศทางเดียวกับค่าผลผลิตรวม วัสดุเพาะที่มีผสมภูเขาไมท์ในระดับ 20% ให้ค่า BE สูงสุด 55-56% (**Table 3.1**) การลดลงของผลผลิตเมื่อมีการผสมยิบซัมในวัสดุเพาะมีรายงานไว้ในการศึกษาเพื่อหาค่าการเติม (A. bisporus) Mau et al. (1993) รายงานว่าการผสมยิบซัลงลงในน้ำที่รดเห็ดมีผลทำให้ผลผลิตของ *A. bisporus* ลดลงเมื่อความเข้มข้นของยิบซัมเพิ่มขึ้น ค่าผลผลิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญสูงถึง 20% เมื่อความเข้มข้นของยิบซัมในน้ำรดเห็ดเป็น 0.3% การลดลงของผลผลิตเมื่อมีการผสมภูเขาไมท์ซัลเฟตในวัสดุเพาะอาจเป็นผลเนื่องมาจากแคลเซียมซัลเฟต (ยิบซัม) ซึ่งเป็นส่วนผสมที่มีความเข้มข้นในระดับสูง (7%)

การเติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟต ในวัสดุเพาะไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *P. ostreatus* ถึงแม้ว่าในบางกรณีผลผลิตอาจลดลงบ้าง

Table 3.1 The time period of different phases of oyster mushroom cultivation, yield and percentage BE of *Pleurotus ostreatus* grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.

Supplement		Treatment code	Spawn running (days)	Fruit body formation (days)	Yield per pack				BE [#] (%)
					1 st flush	2 nd flush	3 rd flush	Total	
Gypsum	0%	C	25.5±1.5	39.4±5.8 ^b	86.05±21.6	74.21±19.0	42.93±15.7	203.19±30.0 ^b	56.44
	5%	G5	24.9±1.8	39.9±4.6 ^b	70.70±29.6	73.85±27.5	55.81±18.6	200.36±35.1 ^b	55.66
	10%	G10	25.2±1.1	34.3±4.8 ^a	57.50±18.0	46.33±10.8	37.78±14.7	141.62±19.1 ^a	37.27
Pumice sulfate	0%	C	25.5±1.5	39.4±5.8 ^b	86.05±21.6	74.21±19.0	42.93±15.7	203.19±30.0 ^b	56.44
	10%	PS10	24.7±1.3	39.4±5.3 ^b	80.53±21.4	71.79±24.9	50.66±22.2	202.97±30.8 ^b	56.38
	20%	PS20	25.2±1.9	33.5±4.0 ^a	74.08±11.4	53.53±13.9	36.55±19.4	163.07±20.6 ^a	45.30
	30%	PS30	24.3±1.2	36.6±5.7 ^{ab}	66.83±23.3	59.80±22.6	37.05±17.1	163.69±26.9 ^a	45.47
Pumice	0%	C	25.5±1.5	39.4±5.8 ^b	86.05±21.6	74.21±19.0	42.93±15.7	203.19±30.0 ^b	56.44
	10%	P10	27.3±2.1	36.2±4.7 ^{ab}	62.91±24.0	47.81±17.1	28.28±9.2	138.99±25.8 ^a	38.61
	20%	P20	25.7±2.6	35.2±5.0 ^a	85.14±18.6	72.19±28.6	56.37±24.2	216.33±28.8 ^b	60.09
	30%	P30	26.3±2.0	35.0±4.2 ^a	79.38±27.9	66.76±20.8	58.88±22.6	203.24±34.2 ^b	56.46

Means followed by the same letter in the same column in the same set of supplement are not significantly different according to the Duncan test ($P \geq 0.05$)

Biological efficiency (BE) is the ratio of fresh mushroom harvested per unit of dry substrate and expressed as a percentage. Values were from 3 flushes.

3.3 Distribution pattern of individual mushrooms weight and size

น้ำหนักของครีบทอกแต่ละตัวของเห็ดนางฟ้า (mushroom caps หรือ basidiomata) ที่เพาะจากวัสดุทุกสูตรมีค่าระหว่าง 0.64g ถึง 62.0g ข้อมูลน้ำหนักของครีบทอกแต่ละครีบลักษณะการแจกแจงไม่เป็นปกติ แต่ข้อมูลมีลักษณะการแจกแจงเป็นทางขวา แสดงให้เห็นว่าตอกเห็ดส่วนใหญ่มีน้ำหนักน้อย (*Figure 3.1*) ข้อมูลน้ำหนักของครีบทอกแต่ละครีบลักษณะการแจกแจงเป็นทางขวามีรายงานสำหรับ *P. eryngii* (Rodriguez Estrada and Royse, 2006) ถึงแม้เห็ดนางฟ้าประเภท *P. eryngii* จะมีลักษณะตอกใหญ่กว่าเห็ดนางฟ้าประเภท *P. ostreatus* เพื่อที่จะแบ่งกลุ่มตอกเห็ดตามขนาดเป็นกลุ่มเล็ก กลางและใหญ่จึงใช้ข้อมูลการแจกแจงน้ำหนักของครีบทอกแต่ละครีบบ้างตามค่า *quantiles* ที่ 33.3% และ 66.6% ดังนั้นตอกเห็ดขนาดเล็กจึงมีน้ำหนัก <6.70g ขนาดกลางมีน้ำหนัก 6.70-12.38g และขนาดใหญ่มิ่้น้ำหนัก >12.38g *Table 3.2* แสดงให้เห็นว่าการเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟตในวัสดุเพาะต่อมีอิทธิพลต่อขนาดของตอกเห็ด เห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมภูไมท์ซัลเฟตที่ 20% และภูไมท์ที่ 10% มีสัดส่วนตอกเห็ดขนาดเล็กถึง 40% สอดคล้องกับปริมาณผลผลิตที่ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ เห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัมที่ 5% มีสัดส่วนตอกเห็ดขนาดใหญ่กว่า 47% มากกว่าตัวอย่างอื่นๆ สำหรับเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมภูไมท์ซัลเฟตที่ 30% และภูไมท์ที่ 20% และ 30% มีสัดส่วนตอกเห็ดขนาด

เล็ก กลาง และใหญ่เท่าๆกันคือ ขนาดเฉลี่ยประมาณ 30% (*Table 3.2*)

สายพันธุ์และสารที่เติมลงในวัสดุเพาะมีอิทธิพลต่อสัดส่วนของขนาดตอก Rodriguez Estrada and Royse (2006) รายงานว่า Mn, Cu และกำมะถันมีอิทธิพลต่อขนาดตอกเห็ด *P. eryngii*

มีรายงานว่าแคลเซียมคลอไรด์มีอิทธิพลทั้งในเชิงบวกและลบต่อน้ำหนักเฉลี่ยของตอกเห็ดทั้งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เห็ดและปริมาณที่ใช้ (Barden *et al.* 1990; Solomon *et al.* 1991) Diamantopoulou and Philippoussis (2001) รายงานว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์ในน้ำรดเห็ด *A. bisporus* ที่ความเข้มข้น 0.10 and 0.15% เพิ่มสัดส่วนของเห็ดตอกใหญ่ขณะที่การใช้แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้นอื่นๆเพิ่มสัดส่วนของเห็ดขนาดเล็ก ในรายงานวิจัยของผู้เขียนการเติมยิบซัม (แคลเซียมซัลเฟต) ในวัสดุเพาะที่ระดับ 5% เพิ่มสัดส่วนของตอกเห็ดขนาดใหญ่ แต่การเพิ่มระดับยิบซัมมากกว่านี้จะเพิ่มสัดส่วนตอกเห็ดขนาดเล็กและกลาง อย่างไรก็ตามสำหรับเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) การเติม calcium carbonate (CaCO_3) ลงในวัสดุเพาะลดขนาด (น้ำหนัก) ของเห็ดเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม โดยการเติม CaCO_3 เข้มข้น 0.6% ให้ตอกเห็ดน้ำหนักเฉลี่ย 15.1g ขณะที่น้ำหนักตอกเห็ดเฉลี่ยที่เพาะในวัสดุเพาะสูตรควบคุมคือ 16.8g (Royse and Sanchez-Vazquez 2003).

เส้นผ่านศูนย์กลางครีบทอกวัดจากครีบทอกแต่ละตอกมีค่าระหว่าง 2.0cm ถึง 16.0cm ข้อมูลเส้นผ่านศูนย์กลางของครีบทอกแต่ละครีบลักษณะการแจกแจงเป็นปกติ โดยมีค่าเฉลี่ย

เส้นผ่านศูนย์กลางครึ่งดอกคือ $7.3 \pm 2.26 \text{ cm}$ (Figure 3.1) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางครึ่งดอกของเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะสูตรต่างๆมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัมที่ 5% มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางครึ่งดอกสูงสุด เห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัมที่ 10% มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางครึ่งดอกไม่แตกต่างกันจากเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะสูตรควบคุมแม้ว่าค่าปริมาณผลผลิตรวมมีค่าต่ำกว่า

Table 3.2 แสดงค่าความหนาแน่นของก้านดอกเห็ด *P. ostreatus* พบว่าการเติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟต ในวัสดุเพาะไม่มีผลต่อความหนาแน่นของก้านดอก แต่การเติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟต ในวัสดุเพาะมีแนวโน้มเพิ่มความหนาแน่นของครึ่งดอกถึงแม้ค่าจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ การใช้แคลเซียมคลอไรด์กับ *A. bisporus* ก็ไม่ได้แสดงว่าช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสอย่างเด่นชัด Diamantopoulou and Philippoussis (2001) พบว่าการใช้แคลเซียมคลอไรด์กับ *A. bisporus* ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เช่น 0.05 และ 0.10% ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสแต่เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น คือ $> 0.15\%$ เห็ดกลับมีเนื้อสัมผัสนุ่มลงมาก

โดยสรุปการเติมภูเขาไมท์ในวัสดุเพาะที่ระดับสูงถึง 30% ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตรวม ขนาดดอกและเส้นผ่านศูนย์กลางครึ่งดอก การเติมยิบซัมในวัสดุเพาะที่ระดับ 10% ลดปริมาณผลผลิตรวม และถึงแม้การเติมยิบซัมในวัสดุเพาะที่ระดับ 5% ไม่ได้ลดปริมาณผลผลิตรวม แต่มีผลในการเพิ่มสัดส่วนดอกเห็ดขนาดใหญ่ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์กระป๋องเนื่องจากต้องใช้ดอกเห็ดขนาดเท่าๆกันไม่ใหญ่เกินไป การเติมภูเขาไมท์ซัลเฟตในวัสดุเพาะที่ระดับมากเกินไปมีผลในการลดผลผลิตรวม

3.4 Calcium and silicon content in fresh mushrooms

Table 3.3 แสดงปริมาณแคลเซียมในก้านและครึ่งดอกเห็ดนางฟ้าที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัม ภูเขาไมท์ และภูเขาไมท์ซัลเฟตจากผลผลิตสองรุ่น ปริมาณแคลเซียมในก้านดอกมีค่า 0.070-0.137mg/g dry weight และ 0.050-0.115mg/g dry weight ในครึ่งดอก Wang et al. (2001) พบว่า *P. ostreatus* ที่เพาะใน spent beer grain มีปริมาณแคลเซียม 3.9mg/100g ของน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดซึ่งต่ำกว่าที่รายงานในงานวิจัยนี้ ปริมาณแคลเซียมใน *P. eryngii* และ *P. ostreatus* ที่เกิดตามธรรมชาติ พบว่ามีปริมาณ 0.84 and 1.26mg/g คือน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Genccelep et al. 2009) Chang et al. (1981) รายงานว่าปริมาณแคลเซียมในดอกเห็ด *P. sajor-czej* อยู่ในช่วง 0.189-0.362mg/g น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด Akindahunsi and Oyelayo (2006) รายงานปริมาณแคลเซียมในครึ่งดอกและก้านดอกของ *P. tuber-regium* ที่ค่า 2.9 and 1.2mg/g ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ Ragunathan et al. (1996) รายงานปริมาณแคลเซียมในดอกเห็ดตระกูล *Pleurotus* spp. (*P. sajor-czej*, *P. platypus* และ *P. citrinopileatus*) อยู่ในช่วง 0.75-2.45mg/g การที่ปริมาณ

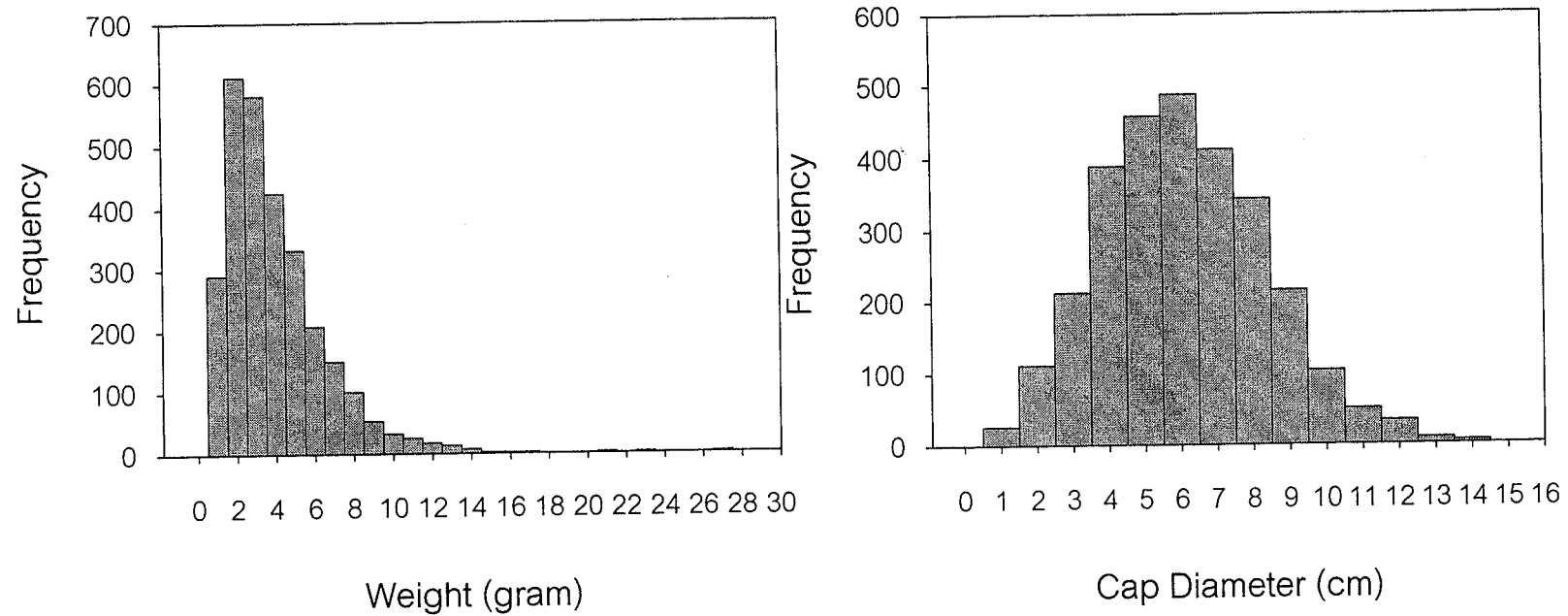


Figure 3.1 a.) A histogram showing the distribution of individual (2,848) mushroom weights. Quantiles 33.3% (6.70 g) and 66.6% (12.28 g) were used to delimit mushroom size classes (small, medium, large) b.) A histogram showing the distribution of individual (2,848) mushroom cap diameter showing normal distribution curve with mean of 7.3 cm and standard deviation of 2.26 cm. The caps with diameter of 7.3 ± 2.26 cm were used to produce canned mushrooms.

Table 3.2 Size classes (small, medium, large) expressed as a percentage of the total mushroom production per treatment. Quantiles 33.3% (6.70 g) and 66.6% (12.28 g) were used to delimit mushroom size classes (small, medium, large), mushroom cap diameter (cm) and firmness (kgf) of *Pleurotus ostreatus* grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.

Treatment code	Size classes (%)			Cap diameter (cm)	Hardness (kgf)	
	Small	Medium	Large		Stalk	Cap
C	35.03	33.27	31.70	7.3±2.5 ^a	3.432±0.139	0.730±0.060 ^a
G5	20.49	31.78	47.73	8.1±2.3 ^b	3.654±0.505	1.050±0.006 ^b
G10	37.32	37.88	24.80	7.2±2.2 ^a	3.392±0.471	1.146±0.096 ^b
C	35.03	33.27	31.70	7.3±2.5	3.432 ±0.139	0.730±0.060
PS10	27.62	34.78	37.60	7.4±2.2	4.074±0.419	0.990±0.072
PS20	41.70	33.55	24.75	7.0±2.2	3.588±0.658	1.226±0.127
PS30	31.05	33.72	35.23	7.4±2.2	3.260±0.230	1.042±0.120
C	35.03	33.27	31.70	7.3±2.5	3.432±0.139	0.730±0.060 ^a
P10	42.69	35.85	21.46	6.9±2.0	3.432±0.130	1.248±0.123 ^b
P20	35.05	33.27	31.70	7.1±2.2	3.510±0.283	1.208±0.116 ^{ab}
P30	31.50	32.20	36.30	7.2±2.2	3.342±0.130	0.952±0.108 ^{ab}

* Number of individual mushroom samples taken for size class and cap diameter measurement was 332 for C, 291 for G5, 231 for G10, 346 for PS10, 355 for PS20, 296 for PS30, 290 for P10, 424 for P20 and 284 for P30.
Means followed by the same letter in the same column in the same set of supplement are not significantly different according to the Duncan test ($P \geq 0.05$)

Table 3.3 The calcium content (mg/g dry wt.) and silicon content (mg/g dry wt.) of *Pleurotus ostreatus* grown on substrates non-supplemented and supplemented with gypsum, pumice sulfate and pumice.

Treatment code	Calcium content (mg/g dry wt.)				Silicon content (mg/ 100 g dry wt.)	
	Stalk		Cap		Stalk	Cap
	1 st flush	2 nd flush	1 st flush	2 nd flush		
C	0.117±0.037	0.061±0.005 ^a	0.073±0.011	0.033±0.003	0.059±0.011	0.076±0.013
G5	0.103±0.018	0.092±0.003 ^{ab}	0.060±0.019	0.040±0.001	0.040±0.004	0.097±0.038
G10	0.104±0.023	0.110±0.026 ^b	0.079±0.012	0.048±0.011	0.058±0.010	0.119±0.048
C	0.117±0.037 ^{ab}	0.061±0.005 ^a	0.073±0.011 ^{ab}	0.033±0.003	0.059±0.011	0.076±0.013
PS10	0.085±0.036 ^a	0.050±0.025 ^a	0.090±0.022 ^b	0.052±0.008	0.045±0.013	0.093±0.032
PS20	0.137±0.012 ^b	0.115±0.040 ^b	0.077±0.021 ^{ab}	0.051±0.015	0.059±0.025	0.098±0.032
PS30	0.088±0.013 ^a	0.084±0.017 ^{ab}	0.046±0.005 ^a	0.036±0.030	0.068±0.013	0.121±0.029
C	0.117±0.037 ^b	0.061±0.005	0.073±0.011 ^{ab}	0.033±0.003	0.059±0.011	0.076±0.013
P10	0.070±0.007 ^a	0.035±0.005	0.051±0.002 ^a	0.047±0.008	0.050±0.008	0.087±0.003
P20	0.117±0.011 ^b	0.066±0.015	0.092±0.032 ^b	0.043±0.008	0.048±0.017	0.084±0.020
P30	0.081±0.006 ^{ab}	0.053±0.018	0.042±0.004 ^a	0.030±0.002	0.044±0.009	0.101±0.016

Means followed by the same letter in the same column in the same set of supplement are not significantly different according to the Duncan test ($P \geq 0.05$)

แคลเซียมในเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus* ที่ศึกษามีความแตกต่างกันเป็นผลมาจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและวัสดุเพาะที่ใช้มีปริมาณแร่ธาตุแตกต่างกัน

ในทุกตัวอย่างปริมาณแคลเซียมทั้งในก้านดอกและครีบดอกของเห็ดรุ่นที่สองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเติมยิบซัม ภูเขาไฟ และภูเขาไฟฟอสเฟต ในวัสดุเพาะไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในก้านดอกของเห็ดที่เก็บเกี่ยวในรุ่นแรก ปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในตัวอย่างเห็ดจากวัสดุเพาะที่มีการเติมยิบซัมและภูเขาไฟฟอสเฟต ปริมาณแคลเซียมในครีบดอกมีปริมาณต่ำกว่าในก้านดอกเช่นเดียวกับก้านดอกเมื่อเทียบต่อน้ำหนักแห้ง การเติมยิบซัม ภูเขาไฟ และภูเขาไฟฟอสเฟต ในวัสดุเพาะไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในครีบดอกของเห็ดที่เก็บเกี่ยวในรุ่นแรก อย่างไรก็ตามผลการศึกษากการเติมแคลเซียมทั้งในรูป calcium sulfate (gypsum) และ calcium chloride ในน้ำรดเห็ดกระตุ้นการเติบโตของเห็ด ทำให้ปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (Simons and Beelman 1996) ผลการวิจัยนี้แตกต่างจากผลการทดลองของเราอาจเนื่องมาจากรูปแบบการให้แคลเซียมแตกต่างกัน แคลเซียมที่เติมลงในน้ำรดเห็ดอาจจะไม่ถูกดูดซึมลงไปในพื้นที่เยื่อแต่ละสมบนผิวนอกทำให้ตรวจวัดได้ง่ายกว่า

ในวัสดุเพาะทุกสูตรมีการเติมปูนขาว (CaCO_3) ลงไปเพื่อจุดประสงค์ในการปรับสภาพให้ค่า pH (5.5±6.5) CaCO_3 มีผลต่อค่า pH ในขณะที่ใช้ CaSO_4 ไม่มีผลต่อค่า pH มีผลเพียงต่อปริมาณแร่ธาตุ (Yildiz et al. 1998; Royse and Sanchez-Vazquez 2003) ซึ่งเลื่อยจากไม้ยางพารา รำข้าวซึ่งเป็นสององค์ประกอบหลักในวัสดุเพาะซึ่งอาจเป็นแหล่งของแคลเซียมด้วย *P. ostreatus* อาจไม่สะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้นเมื่อมีระดับของแคลเซียมมากอยู่แล้วดังนั้นเป็นไปได้ว่าเมื่อวัสดุเพาะมีระดับของแคลเซียมอิ่มตัวแล้วและดูดซึมเข้าไปในเนื้อเยื่ออิ่มตัวแล้ว ดังนั้นการเติมแคลเซียมในวัสดุเพาะเพิ่มขึ้นก็จะไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อ

Chiu et al. (1998) ใช้แคลเซียมที่ละลายน้ำได้ (CaCl_2) ในการเพาะ *P. pulmonarius* และพบว่าปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นทั้งในครีบดอกและก้านดอก ซึ่งแตกต่างจากการใช้แคลเซียมในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำ (calcium carbonate) พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมในเห็ด ผู้วิจัยเสนอว่าแคลเซียมที่ไม่ละลายน้ำจะถูกนำไปใช้ได้ก็ต่อเมื่อมีการเคลื่อนตัวผ่านทางเมตาบอลิซึมของเห็ด ดังนั้นไอออนของ Ca^{2+} จึงถูกปลดปล่อยช้า ดังนั้นต้องใช้แคลเซียมรูปที่ไม่ละลายน้ำในปริมาณสูงจึงจะเห็นผลที่ศึกษาการกระตุ้นด้วยแคลเซียม การงานวิจัยของเราแคลเซียมที่เติมในวัสดุเพาะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (ยิบซัม, CaSO_4) ไม่ได้ใช้รูปที่ละลายน้ำได้ CaCl_2 เนื่องจากในทางปฏิบัติในการเพาะเห็ดมักใช้ยิบซัม ดังนั้นการใช้แคลเซียมในรูปแบบที่ไม่ละลายน้ำอาจเป็นสาเหตุทำให้ไม่พบว่ามีปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อแตกต่างกันสำหรับวัสดุเพาะแต่ละสูตร

Table 3.3 แสดงปริมาณธาตุลิกอนในก้านและครีบดอกเห็ดนางฟ้าที่เพาะในวัสดุเพาะที่เติมยิบซัม ภูเขาไฟ และภูเขาไฟฟอสเฟต ธุลิกอนสะสมในครีบดอกเห็ดมากกว่าในก้านดอกประมาณ 2 เท่า ระดับของซิลิกอนในเห็ดค่อนข้างต่ำมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างนางฟ้าซึ่งมีซิลิกอนอยู่ 0.3-0.4mg/g

dry sample (Samadi-Maybodi and Atashbozorg 2006) ข้าวสะสมซิลิคอนที่หยอดและลำต้น มาก ถึง 10% ของน้ำหนักแห้ง (Ma et al. 2002) ขณะที่รากของ spinach plant มีความเข้มข้นของ ซิลิคอนประมาณ 4mg/g dry weight และประมาณ 1mg/g ของน้ำหนักแห้งของลำต้น (Gunes et al. 2007) ความแตกต่างของปริมาณซิลิคอนเหล่านี้อาจเนื่องมาจากเหตุที่ไม่สามารถสะสมซิลิคอนไว้ในเนื้อเยื่อเหมือนกับข้าวและ spinach plant มีรายงานว่าปริมาณในส่วนบนของพืชแปรผันอย่าง มากตามชนิดของพืชตั้งแต่ 0.1% ถึง 10.0% ของน้ำหนักแห้ง จากปริมาณซิลิคอนของพืชส่วนบน จึงสามารถแบ่งชนิดของพืชตามการสะสมของซิลิคอนเป็นพืชที่สะสมซิลิคอน silicon accumulator ชนิดที่สะสมปานกลาง intermediate type และชนิดที่ไม่สะสม silicon excluder species เป็นที่รู้ กันว่าข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชชนิดที่สะสมซิลิคอนที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Ma et al. 2002)

การเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซิลเฟต ในวัสดุเพาะสำหรับการผลิต *P. ostreatus* ไม่มีผล ต่อปริมาณซิลิคอนในก้านดอกและครีบดอกของ *P. ostreatus* อย่างไรก็ตามปริมาณซิลิคอนในครีบ ดอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณภูไมท์และภูไมท์ซิลเฟตในวัสดุเพาะเพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าจะไม่แตกต่างกัน ทางสถิติก็ตาม ความเข้มข้นของซิลิคอนในก้านดอกไม่แตกต่างกันในเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะแต่ละ สูตร สำหรับ spinach plants ซิลิคอนสะสมในรากและลำต้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการเติม ซิลิคอน ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_7$) ลงไปในดิน (Gunes et al. 2007) ดังนั้นเชื้อเห็ดที่มีการให้ซิลิคอนบริสุทธิ์ในรูป silicon dioxide ในอัตรา 1g/L ของสับสเตรต มีซิลิคอนสะสมในรากมากกว่าต้นที่ไม่ได้ใช้ซิลิคอน แต่ในลำต้นปริมาณซิลิคอนไม่แตกต่างกัน (Diogo and Wydra 2007)

ในการศึกษาการเพาะเห็ดนางฟ้า *P. sajor-caju* บนฟางข้าวเจ้าและข้าวสาลีพบว่าปริมาณ ซิลิคอนในวัสดุเพาะกลับเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการเพาะเพิ่มขึ้นในขณะที่องค์ประกอบอื่น ๆ มีปริมาณ ลดลงหรือคงที่ ถ้าองค์ประกอบในวัสดุเพาะมีปริมาณลดลงหรือคงที่ก็คาดเดาได้ว่า *P. sajor-caju* ใช้ องค์ประกอบนั้นในการเจริญ (*Zhang et al. 2002*) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเห็ด นางฟ้าไม่ได้ใช้ซิลิคอนซึ่งเป็นที่สงสัยเกี่ยวกับการนี้ของงานวิจัยนี้

3.5 Effect of silicon and calcium in liquid medium on mycelial growth

Table 3.4 แสดงปริมาณแคลเซียม (mg/g dry wt.)และซิลิคอน (mg/g dry wt.)ในเส้นใย *P. ostreatus* ที่เจริญบนอาหารเหลว WPDY อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรประกอบด้วยอาหารเหลว WPDY ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมหรือซิลิคอนเพิ่มเติม อาหารเหลว WPDY ที่มีการเติม CaSO_4 ที่ สอดระดับความเข้มข้น (5, 10mg/l) อาหารเหลว WPDY ที่มีการเติม $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_7$ ที่สองระดับความ เข้มข้น (5, 10mg/l) และที่มีการเติม $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_7$ และ CaSO_4 อย่างละ 5mg/l ในการทดลองนี้ได้เลือกให้ อาหารเหลว WPDY เนื่องจากมีการรายงานว่าเส้นใย *P. ostreatus* ที่เลี้ยงบนอาหารเหลวชนิดนี้ให้ ค่า biomass สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ potato-dextrose (PD) และ potato-dextrose-yeast extract (PDY) (Serafin Munoz et al. 2006) หลังจากเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าของอาหารเหลวแล้วเส้นใย

ถูกทำให้แห้ง บดเป็นผงละเอียด แล้วย่อยด้วยกรด (acid-digested) วัดปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสโดยใช้ ICP แคลเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกดูดซึมเข้าสู่เส้นใย 1,000 เท่าของฟอสฟอรัสที่จริงแล้วฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อยมาก สามารถวัดได้แต่ค่าความแปรปรวนสูง จาก **Table 3.4** จะเห็นว่าแคลเซียมที่เติมลงไปไม่มีผลโดยตรงกับปริมาณแคลเซียมที่วัดได้ในเส้นใย ถึงแม้ทุกระดับความเข้มข้นแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เติมลงไปไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ปริมาณแคลเซียมในเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารเหลว WPDY ที่ไม่มีการเติมแคลเซียมหรือฟอสฟอรัสดูเหมือนจะมีปริมาณน้อยกว่าในตัวอย่างที่เติมแคลเซียมและฟอสฟอรัสแต่ค่าที่วัดได้ไม่มีผลแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมของตัวอย่างที่เติมแคลเซียมที่ 5mg/l กับที่ 10mg/l ก็ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างกัน การทดลองนี้ให้ผลคล้ายกับข้อ 3.4 ที่ไม่พบว่าแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่เติมลงไปมีผลกับปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในเนื้อเยื่อทั้งในเส้นใยและดอกเห็ด มีความเป็นไปได้ว่าทั้งในเนื้อเยื่อเส้นใยและดอกเห็ดไม่สะสมฟอสฟอรัส ขณะที่แคลเซียมนั้นถูกสะสมในเนื้อเยื่อแต่ก็ไม่ได้เห็นความแตกต่างเมื่อมีการเติมแคลเซียมในรูปแบบ CaSO_4 อาจเป็นผลเนื่องมาจากในอาหารเหลว WPDY หรือในวัสดุเพาะมีแคลเซียมเพียงพอในการเจริญของเส้นใยการเติมเข้าไปอีกจึงไม่มีผลเพราะระดับแคลเซียมในเนื้อเยื่อถึงระดับอิ่มตัวแล้ว การที่เราจะใช้อาหารเหลวหรือวัสดุเพาะนั้นเป็นไปได้อย่างเหมาะสมนอกจากแคลเซียมจำเป็นต่อการเจริญของเส้นใย และไม่สามารถหลีกเลี่ยงแคลเซียมที่มีอยู่ตามธรรมชาติซึ่งอยู่ในวัสดุเพาะได้

3.6 Drip loss values and solid content

ถึงแม้ว่าการเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟต ในวัสดุเพาะสำหรับการผลิต *P. ostreatus* ไม่มีผลต่อการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสในดอกเห็ด การใช้ยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟตมีค่าสูงกว่าคริปและกำกวมดอกเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่มีการเติมยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟตมีค่าสูงกว่าค่า drip loss ของตัวอย่างควบคุม ยิ่งปริมาณยิบซัม ภูไมท์ และภูไมท์ซัลเฟตในวัสดุเพาะมีค่าสูงขึ้น ค่า drip loss ของคริปและกำกวมดอกเห็ดยิ่งสูงขึ้น ตัวอย่างเช่นเมื่อปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในวัสดุเพาะเพิ่มขึ้นค่า centrifugal drip loss เพิ่มขึ้น เช่น ในกรณีของ G5 และ G10 ซึ่งปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นจาก 9.4 เป็น 18.9g/kg ของนน.วัสดุเพาะ และในกรณีของ P10 และ P30 ซึ่งปริมาณฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจาก 48.6 to 145.9g/kg ของนน.วัสดุเพาะ (ตัวอย่างปริมาณแคลเซียม <2.2 g/kg ของนน.วัสดุเพาะ) ในกรณี PS10 และ P30 ปริมาณฟอสฟอรัสแปรผันจาก 24.3 เป็น 72.9g/kg ของนน.วัสดุเพาะ และปริมาณแคลเซียมแปรผันจาก 8.5 เป็น 25.5g/kg ของนน.วัสดุเพาะ ในการนี้ของ G10 ซึ่งมีปริมาณแคลเซียม 18.9g/kg ของนน.วัสดุเพาะ และ PS10 ซึ่งมีปริมาณแคลเซียมน้อยกว่า G10 ครึ่งหนึ่ง (8.5g/kg ของนน.วัสดุเพาะ) แต่มีฟอสฟอรัส (24.3g/kg ของนน.วัสดุเพาะ) ค่า drip loss ของ

G10 และ PS10 มีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าทั้งแคลเซียมและซิลิโคนในวัสดุเฉพาะมีอิทธิพลต่อค่า drip loss

การละลายน้ำแข็งในอาหารแช่เยือกแข็งทำให้น้ำในเนื้อเยื่อแยกตัวออกจากโครงสร้างอาหารทำให้เกิดค่าที่เรียกว่า % drip loss และการสูญเสียเนื้อสัมผัส โดยหลักการแล้วผักผลไม้สดที่มีการ pre-treatment โดยแคลเซียมก่อนกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความเย็นหรือความร้อนช่วยทำให้หนึ่งเซลล์แข็งแรงซึ่งช่วยลดการทำลายผนังเซลล์ซึ่งจะการละลายน้ำแข็งทำให้การปลดปล่อยน้ำหรือค่า drip loss ลดลง มีรายงานอิทธิพลของ pre-treatments และ long และ short-term frozen storage ต่อคุณภาพของราสเบอร์รี่ แสดงให้เห็นว่าการใช้แคลเซียมในการ pre-treatments ก่อนการแช่เยือกแข็งช่วยลดการสูญเสียเนื้อสัมผัสระหว่างการเก็บรักษาตลอดจนลดค่า % drip loss (Souza et al. 2005) ในกรณีของ *P. ostreatus* แคลเซียมที่เติมลงไปในวัสดุเฉพาะมีอิทธิพลต่อเนื้อเยื่อของเห็ดแตกต่างจากพืชอื่นๆ ในงานวิจัยนี้ปริมาณแคลเซียมในตัวอย่างควบคุมไม่แตกต่างกันจากตัวอย่างที่มีการเติมแคลเซียมแต่ค่า drip loss และ solid content ของเห็ดที่เพาะในวัสดุเฉพาะที่เติมแคลเซียมสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมแคลเซียม ผลการทดลองนี้บ่งบอกว่าแคลเซียมและที่เติมลงไปไม่ได้ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงขึ้นแต่การที่ค่า drip loss สูงขึ้นบ่งบอกว่าตัวอย่างที่เพาะในวัสดุเฉพาะที่เติมแคลเซียมและซิลิโคนมีน้ำอิสระ (free water) ในเนื้อเยื่อมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ค่า centrifugal drip loss มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าความชื้นในตัวอย่าง ซึ่งสัมพันธ์อีกต่อหนึ่งกับค่า solid content จะเห็นได้ว่าก้านดอกเห็ดมีค่า solid content สูงกว่าแต่ค่า centrifugal drip loss ต่ำกว่าครีบอกเห็ด ค่า solid content ของครีบอกเห็ดที่เพาะในวัสดุเฉพาะที่เติมยิบซัม ภูเขาไฟและภูเขาไฟซัลเฟตสูงกว่า solid content ของตัวอย่างควบคุม ค่า solid content ของทั้งก้านดอกและครีบอกเห็ดขึ้นเมื่อภูเขาไฟซัลเฟตในวัสดุเฉพาะเพิ่มขึ้น การเพิ่มปริมาณยิบซัมในวัสดุเพาะมีแนวโน้มในการเพิ่ม solid content ของดอกเห็ด ถึงแม้จะไม่แตกต่างทางสถิติ การเพิ่มปริมาณภูเขาไฟในวัสดุเพาะไม่เพิ่ม solid content ในดอกเห็ด แสดงให้เห็นว่าปริมาณแคลเซียมวัสดุเพาะจำเป็นต่อการเพิ่ม solid content ของดอกเห็ด ค่า solid content ของดอกเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่ยิบซัมและภูเขาไฟมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกัน

ปริมาณความชื้นของ *P. ostreatus* ที่เพาะบนฟางข้าวสาลีที่มีการเติม sugar beet มีค่า 90.7% (หรือค่า solid content เท่ากับ 9.3%) (Bonatti et al. 2004) ค่า solids content ของครีบอกเห็ดนั้นใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยของเรา อิทธิพลของการเติมแคลเซียมต่อค่า solid content มีรายงานแตกต่างกันในแต่ละงานวิจัยเนื่องจากสภาวะในการทดสอบแตกต่างกัน Simons and Beelman (1996) พบว่าการเติม 0.3% calcium chloride ในน้ำรดเห็ดเพิ่มค่า solid content ของเห็ด *A. bisporus* อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ขณะที่อีกรายงานหนึ่งโดย

Chikthimma et al. (2005) การใช้ 0.3% calcium chloride ในน้ำรดเห็ดไม่มีผลต่อค่า solid content ของเห็ด *A. bisporus*

ชนิดของวัสดุเพาะมีผลต่อค่า solid content ของ *Pleurotus spp.* ดอกเห็ด *P. sajor-caju* CCB 019 มีค่าปริมาณความชื้น เมื่อเพาะในฟางข้าว (Bonatti et al. 2004) การเติม micronutrients ในวัสดุเพาะอาจลด solid ของเห็ด Weil et al. (2006) พบว่าค่า solid ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติม 276mg/kg manganese (crop 3010) และ 92mg/kg manganese (crop 3011) ในวัสดุเพาะ *A. bisporus*

ในการศึกษานี้ถึงแม้ไม่พบว่าแคลเซียมและซิลิกอนสะสมในเนื้อเยื่อของเห็ดเมื่อการเติมยิบซัม ภูเขาไมท์หรือภูเขาไมท์ซิลเฟตลงในวัสดุเพาะ แต่มีผลในการเพิ่มค่า drip loss และ solid content การเพิ่มขึ้นของค่า centrifugal drip loss บ่งบอกว่าการเติมยิบซัม ภูเขาไมท์หรือภูเขาไมท์ซิลเฟตลงในวัสดุเพาะ ทำให้เนื้อเยื่อเห็ดสามารถอุ้มน้ำได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของค่า solid content อาจบ่งบอกได้ว่าป็นผลจากการที่เส้นใยเห็ดซึ่งรวมตัวเป็นเนื้อเยื่อเห็ดมีความหนาแน่นมากขึ้นหรือมีผนังหนาขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งเรื่องนี้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก

3.7 Scanning electron microscope (SEM)

Figure 3.3 แสดง microstructures ของภาคตัดขวางของก้านและดอกเห็ดหลังจากการบรรจุกระป๋อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนลึกลับ hyphae ที่มีรูอยู่ตรงกลาง หลังจากการให้ความร้อนที่ 121°C เป็นเวลา 15min พบเยื่อสีขาวบริเวณตรงกลาง hyphae ทั้งตัวอย่างครีบก้นและก้านดอก เยื่อสีขาวที่ออกมาคาดว่าเป็น polysaccharides ภายใน hyphae ที่หลุดออกมา polysaccharides ทำให้ความยืดหยุ่นเสียไป นอกจากนี้ยังพบผนัง hyphae บางอันเสียรูป มีรายงานการเสียรูปของผนัง hyphae ที่อ่อนตัวกับการสูญเสียองค์ประกอบของเซลล์ใน *A. bisporus* ที่ผ่านความร้อน (Zivanovic et al. 2000) และใน winter mushrooms (*Flammulina velutipes*) (Ko et al. 2007)

hyphae ของก้านดอกจับตัวกันหนาแน่นกว่า hyphae ในครีบก้นซึ่งสัมพันธ์กับค่าความแน่นเนื้อของก้านดอกที่มีค่าสูงกว่าในครีบก้น แสดงให้เห็นว่ายิ่ง hyphae จับตัวกันแน่นค่าความแน่นเนื้อจะมีค่าสูงขึ้น Zivanovic et al. (2000) รายงานว่าการอ่อนตัวของ *A. bisporus* ที่ผ่านความร้อน สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของช่องว่างระหว่างเซลล์ (hyphae) hyphae ของเห็ดที่เพาะในวัสดุเพาะที่มีการเติมซิลิกอนและ/หรือแคลเซียมมีลักษณะการเกาะตัวกันหนาแน่นกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งจับตัวกันหลวมกว่าและบางส่วนมีการเสียรูป อิทธิพลของการเติมซิลิกอนและ/หรือแคลเซียมในวัสดุเพาะต่อการเกาะตัวกันที่หนาแน่นขึ้นของ hyphae เห็นได้ชัดเจนในตัวอย่างก้านดอกหลังการแปรรูปด้วยความร้อน หลังจากกระบวนการให้ความร้อนผนัง hyphae เกาะติดกับ hyphae ข้างๆ