การจำแนกเชื้อเห็ด และการหาแนวทางการเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตสารสำคัญในเส้นใย

IDENTIFICATION OF FUNGI AND FINDING THE WAYS OF CULTURE FOR PRODUCTION THE IMPORTANT SUBSTANCES IN THE MYCELIUM.

พลอยไพลิน ทองนพรัตน์
ไพรินทร์ สุวรรณคต
ภรพิมล ธรรมเจริญ

โครงงานศึกษาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกเชื้อเห็ด และการหาแนวทางการเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตสารสำคัญในเส้นใย

IDENTIFICATION OF FUNGI AND FINDING THE WAYS OF CULTURE FOR PRODUCTION THE IMPORTANT SUBSTANCES IN THE MYCELIUM.

T149283

พลอยไพลิน ทองนพรัตน์
ไพรินทร์ สุวรรณคต
ภรพิมล ธรรมเจริญ

ส/ว. ว45ก 2558
b00266427
b12878303
เลขหมู่ 149283
เลขทะเบียน
วัน เดือน ปี 30 มิ.ย. 2561

โครงงานศึกษาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF FUNGI AND FINDING THE WAYS OF CULTURE FOR PRODUCTION THE IMPORTANT SUBSTANCES IN THE MYCELIUM.

PLOYPHAILIN THONGNOPPARAT
PAIRIN SUWANNAKOT
PORNPIMOL THAMCHAROEN

A SPECIAL PROJECT IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การจำแนกเชื้อเห็ด และการหาแนวทางการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารสำคัญในเส้นใย

Identification of fungi and finding the ways of culture for production the important substances in the mycelium.

ชื่อนักศึกษา นางสาวพลอยไพลิน ทองนพรัตน์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051135
นางสาวไพรินทร์ สุวรรณคต นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051144
นางสาวภรพิมล ธรรมเจริญ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051145

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายเซ็นต์
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	
ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การจำแนกเชื้อเห็ด และการหาแนวทางการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารสำคัญในเส้นใย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพลอยไพลิน ทองนพรัตน์ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051135
	นางสาวไพรินทร์ สุวรรณคต นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051144
	นางสาวภรพิมล ธรรมเจริญ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051145
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้เป็นการจำแนกเชื้อเห็ด และเพื่อหาแนวทางในการเพาะเลี้ยงในเส้นใยเห็ดถั่งเช่า (C. sinensis) เพื่อผลิตสารสำคัญ คือสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใย โดยทำการคัดเลือกหัวเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ พบว่าหัวเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่เวลา 96 ชั่วโมง ในที่มืดที่มีความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยงหัวเชื้อให้ปริมาณน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 11.13 กรัม/ลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการหาแนวทางที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าในแหล่งคาร์บอนโดยธัญพืชเป็นข้าว 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวสังข์หยด ในสภาวะอาหารแข็งและในสภาวะอาหารเหลว พร้อมทั้งทำการทดสอบด้วยวิธีการสกัดสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนจากเส้นใยเห็ดถั่งเช่า โดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 พบว่าในอาหารเหลว ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดเท่ากับ 23.18 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับข้าวสังข์หยด คือมีค่าเท่ากับ 23.18 และ 21.57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารแข็ง ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดเท่ากับ 6.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวควบคุม คือใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มในที่มืด คือมีค่าเท่ากับ 6.31 และ 6.43 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เห็ดถั่งเช่า *Cordyceps sinensis* อะดีโนซีน อาหารแข็ง อาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification of fungi and finding the ways of culture for production the important substances in the mycelium.		
Students	Miss. Ployphailin	Thongnopparat	Student ID 55051135
	Miss. Pairin	Suwannakot	Student ID 55051144
	Miss. Pornpimol	Thamcharoen	Student ID 55051145
Degree	Bachelor of Science in Biotechnology		
Department	Biology		
Academic Year	2014		
Advisor Assoc.	Prof. Aree Rittiboon		

Abstract

The objectives of this special project were to conduct the Fungi identification and to determine the effective way of cultivating *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) for producing and extracting cordycepin and adenosine. This study aimed to find suitable conditions for cultivating *C. sinensis* by selecting inoculum. The results showed that the selected inoculum under the centrifugation speed at 150 rpm at 96 hours, 20 °C yielded the highest dry weight of 11.13 g/L at 120 hours, which was not statistically significant difference when finding the right cultivation method.

C. sinensis in carbon source consisted of two type of rice: Rice Berry and Sangyod rice in solid state and submerge state fermentation. Extracting cordycepin and adenosine from *C. sinensis* was conducted by 50% ethanol. The results showed that in submerge state, Rice Beery yielded the highest content of adenosine at 23.18 mg / mL, which did not differ significantly from Sangyod rice (21.57 mg/mL). In solid state, Rice Beery yielded the highest content of adenosine at 6.31 mg/mL, which did not differ significantly from Sangyod rice (6.43 mg/mL), which was used as the carbon source and under dark cultivation.

Keywords: Rice Berry, *Cordyceps sinensis*, Adenosine, Solid state, Submerge state.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากหลายบุคคล

ขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ แนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงงานพิเศษ และเป็นผู้ให้การสนับสนุน ให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอบพระคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้ความรู้และคำแนะนำในการใช้เครื่องโครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รวมถึงตรวจสอบและแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอบพระคุณ ดร. สมพิศ สอนโยธา ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ารวมถึงคำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ ให้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ซึ่งนอกจากจะเป็นเนื้อหาวิชาการแล้วยังสอนให้รู้จักหน้าที่และความรับผิดชอบต่องานที่ทำ

ขอบคุณพี่ศันสุนีย์ ภู่ประกิจ นักศึกษาปริญญาโทที่คอยให้ความช่วยเหลือจนโครงงานพิเศษฉบับนี้มีความเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวก จัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือต่างๆสำหรับใช้ในการทดลองนี้

ขอบคุณครอบครัว พี่ๆ เพื่อนๆ ที่คอยให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือในทุกๆเรื่องและดูแลกันอย่างดีมาตลอดโดยเฉพาะในช่วงเวลาที่ยากลำบากและมีปัญหา

นางสาวพลอยไพลิน ทองนพรัตน์
นางสาวไพรินทร์ สุวรรณคต
นางสาวภรพิมล ธรรมเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ถั่งเช่า 3
2.2 สรรพคุณและสาระสำคัญในถั่งเช่า 5
2.2.1 คอร์ไดเซปิน 5
2.2.2 อะดีโนซีน 7
2.3 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตถั่งเช่าธิเบตในสภาวะอาหารเหลว 8
2.3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 8
2.3.2 สภาวะการหมักที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่า 9
2.4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตถั่งเช่าธิเบตในสภาวะอาหารแข็ง 11
2.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 11
2.5 อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ 12
2.6 การผลิตชีวมวลของเส้นใย โดยการหมักในสภาวะต่างๆ 13
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการสารสำคัญในเส้นใยของเห็ดถั่งเช่า 14
2.8 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า 15
2.8.1 การเพาะเลี้ยงด้วยตัวหนอนหรือดักแด้ 15
2.8.2 การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร 15
2.8.3 การเพาะด้วยอาหารจากธรรมชาติ 16
2.8.3.1 ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry) 16
2.8.3.2 ข้าวสังข์หยด 16
2.9 วิธีการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าธิเบตโดยการใช้
(High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) 17
2.9.1 วิธีการหาสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนโดยใช้เครื่อง HPLC 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.10 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ 22
2.10.1 การออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด
(Completely Randomize Design: CRD) 22
2.10.2 การออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง
(Response Surface Methodology; RSM) 23
2.10.3 การออกแบบส่วนประสมกลาง
(Central Composite Design; CCD) 26
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง 28
3.1 วัสดุ และเชื้อจุลินทรีย์ 28
3.1.1 วัตถุดิบ 28
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ 28
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 28
3.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA) เสริม 28
3.2.2 Potato dextrose Broth (PDB) เสริม 28
3.3 สารเคมีและอุปกรณ์ 28
3.4 วิธีการเตรียมหัวเชื้อ 29
3.4.1 หัวเชื้อจุลินทรีย์ 29
3.4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อในอาหารเหลว 29
3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง 29
3.5.1 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย
โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 29
3.5.2 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย
การผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 29
3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดถั่งเช่าธิเบต 30
3.6.1 การวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน 30
3.7 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเส้นใย
ของเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 30
3.7.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น 30
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 32
4.1 การศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหัวเชื้อในอาหารเหลว 32
4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง 32
4.2.1. การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย
โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.2 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย
โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 33
4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดถั่งเช่า 34
4.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 36
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก 42
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร 43
ภาคผนวก ข วิธีการเพาะเลี้ยง 45
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์ 46
ภาคผนวก ง วิธีการคำนวณ 47
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 ปริมาณ (มิลลิกรัม/กรัม) ของสารประกอบในเห็ดถั่งเช่าที่ได้จากวิธีการเพาะและแหล่งที่แตกต่างกัน 8
ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของข้าวสังข์หยดเทียบกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ 17
ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ 19
ตารางที่ 2.4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปวน (ANOVA) 23
ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 28
ตารางที่ 4.1 ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของหัวเชื้อในสภาวะเขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ 33
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารอะดีโนซีนจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในอาหารเหลว 33
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารอะดีโนซีนจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในอาหารแข็ง 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1.1 ถิ่นที่อยู่ของ *Cordyceps* ในประเทศจีน 1
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอร์ไดเซปินและกรดคอร์ไดเซปิก 4
ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าธิเบต 5
ภาพที่ 2.3 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ 5
ภาพที่ 2.4 รูปแสดงความสัมพันธ์ของสารคอร์ไดเซปินในกระบวนการทางชีวเคมี รวมถึงกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การรวมตัวของเกล็ดเลือด การแพร่กระจาย การต่อต้านการอักเสบเซลล์อะพอพโตซีส และวิถีการส่งสัญญาณของเซลล์ 7
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของอะดีโนซีน 7
ภาพที่ 2.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ 12
ภาพที่ 2.7 รูปร่างของเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง 18
ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง 25
ภาพที่ 2.9 Contour plot ของพื้นผิวตอบสนองโครงสร้าง 3 มิติ 25
ภาพที่ 2.10 แสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว 26
ภาพที่ 2.11 ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลอง สำหรับ 2 ปัจจัย 27
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

"ถั่งเช่า" หรือที่รู้จักกันว่า "ไวอากร้าแห่งเทือกเขาหิมาลัย" หรือ ตังถั่งเช่า หรือ ตังถั่งแห่เช่า แปลเป็นไทยว่า "ฤดูหนาวเป็นหนอน ฤดูร้อนเป็นหญ้า" หรือที่เรียกกันว่า "หญ้าหนอน" ทั้งนี้เพราะว่ายาสมุนไพรชนิดนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นตัวหนอน คือ ตัวหนอนของผีเสื้อ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hepialus armoricanus Oberthiir* และบนตัวหนอนมีเห็ดชนิดหนึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps sinensis* (Berk.) Saec. (ภาพที่ 1.1) "ถั่งเช่า" ถือได้ว่าเป็นยาสมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศจีนนานนับศตวรรษ มีสรรพคุณทางยาแผนโบราณ และใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย ซึ่งทำให้ความต้องการตลอดจนราคาของเห็ดถั่งเช่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในประเทศจีนและประเทศอื่นๆ ในเอเชีย ซึ่งทำให้ผลผลิตจากธรรมชาติไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากหายาก ดังนั้น จึงมีการนำเทคโนโลยีการหมัก เช่น การหมักในสภาวะอาหารเหลวและการหมักในสภาวะอาหารแข็งมาใช้ประโยชน์สำหรับการผลิตเส้นใยของเห็ดถั่งเช่า

เห็ดถั่งเช่า *Cordyceps sinensis* เป็นสมุนไพรประเภทเชื้อรา มีการค้นพบแล้วมากกว่า 300 ชนิด แต่มีไม่กี่ชนิดที่มีสารออกฤทธิ์หรือสารสำคัญ ซึ่งมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ในเอเชียมีการค้นพบที่เขตปกครองพิเศษธิเบต จีน เนปาล ภูฏาน เกาหลี เวียดนามและไทย

ภาพที่ 1.1 ถิ่นที่อยู่ของ *Cordyceps* ในประเทศจีน : (A) ทุ่งหญ้าที่ระดับความสูง 3,500-5,000 เมตร ส่วนใหญ่อยู่ใน Qinghai, Tibet, Sichuan, Yunnan และ Gansu ; (B และ C) ความซับซ้อนจากปรสิตของเชื้อราและหนอนที่พบในดิน ; (D) *Cordyceps* ที่เก็บมาใหม่ๆ หัวลูกศรชี้ *Cordyceps* ใน (B และ C)

ที่มา Li และคณะ (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. ทำการศึกษาหาแนวทางการเพาะเลี้ยง *Cordyceps sinensis* ในสภาวะอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยการใช้ธัญพืชเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการผลิตสารสำคัญ เช่น สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นใยของเชื้อรา *Cordyceps sinensis*

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการทดสอบหาแนวทางที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่จะนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารแข็งและอาหารเหลว เพื่อใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *Cordyceps sinensis* ต่อการผลิตสารสำคัญ คือ สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยใช้ธัญพืช (ข้าวสังข์หยด และข้าวไรซ์เบอร์รี่) เป็นแหล่งคาร์บอน

2. ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นใยของเชื้อรา *Cordyceps sinensis*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถหาแนวทางการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในสภาวะอาหารแข็งและอาหารเหลว ที่สามารถผลิตสารสำคัญได้สูง

2. สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นธัญพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตสารจากเส้นใย *Cordyceps sinensis*

3. ทราบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่งเช่า

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis*) ภาษาทางวิทยาศาสตร์ คือ *Cordyceps sinensis* มีการจำแนกทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

Kingdom : Fungi
Subkingdom : Dikarya
Phylum : Ascomycota
Subphylum : Pezizomycotina
Class : Sordariomycetes
Subclass : Hypocreomycetidae
Order : Hypocreales
Family : *Clavicipitaceae*
Genus : *Cordyceps sinensis*

ถั่งเช่า เห็ดถั่งเช่า หรือที่เรียกว่า "หญ้าหนอน" ก็เพราะว่า สมุนไพรชนิดนี้ในฤดูหนาวเหมือนหนอน แต่ฤดูร้อนกลับงอกเป็นต้นหญ้า เห็ดถั่งเช่าธิเบต (*Cordyceps sinensis*) เป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่บนเทือกเขาหิมาลัย สรรพคุณของถั่งเช่ามีการค้นพบโดยบังเอิญ เล่ากันว่าสมัยโบราณคนเลี้ยงสัตว์บนที่ราบสูงธิเบตสังเกตเห็นว่าสัตว์ที่ไปกินเห็ดดอกเล็กที่มีลักษณะคล้ายๆ ใบหญ้าแล้วมีสุขภาพแข็งแรง ไม่เป็นโรค และในสัตว์ตัวที่มีอายุมากพบว่ามีท่าทางกระฉับกระเฉงเหมือนเป็นหนุ่มสาว จึงเก็บมากินบ้าง หลังจากทานแล้วพบว่าดีต่อสุขภาพ จัดเป็นยาบำรุงชั้นเลิศ

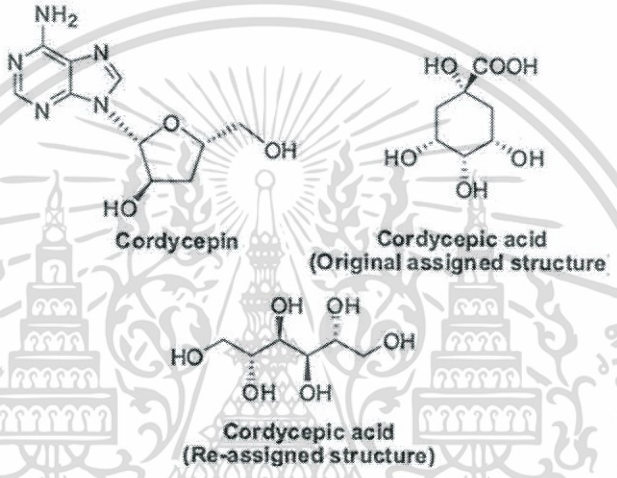
เห็ดถั่งเช่าเป็นราแมลงในกลุ่ม Ascomycetes ที่มีฤทธิ์ทางยา ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ พอลิแซคคาไรด์ (เบต้า-กลูแคน) คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ได-เซปิก (ภาพที่ 2.1) อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด สรรพคุณของสารสำคัญในถั่งเช่า เช่น พอลิแซคคาไรด์ (เบต้า-กลูแคน) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มภูมิคุ้มกัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด มีความน่าจะเป็นในการลดการโตของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ยืดอายุและชะลอความเสื่อมของเซลล์ คอร์ไดเซปิน มีฤทธิ์บำรุงไต เพิ่มประสิทธิภาพการไหลเวียนของโลหิต ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค กรดคอร์ไดเซปิน ช่วยเพิ่มเมตาบอริซึมของร่างกาย ป้องกันเลือดออกในสมอง ลิ่มเลือด โรคหัวใจขาดเลือด และหอบหืด อะดีโนซีน ช่วยต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านลิ่มเลือด

วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า เข้าใจกันว่าเมื่อเชื้อราแมลงได้ล่วงล้ำเข้าไปในวงจรชีวิตของแมลง อาจเกิดจากการที่สปอร์เชื้อราตกลงบนตัวแมลง หรือจากการที่แมลงกินอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อราเข้าไป เส้นใยของราจะฝังตัวเข้าสู่อวัยวะภายใน และเจริญเติบโตอยู่ในเจ้าบ้าน (ตัวแมลง) ด้วยการกินอาหารจากตัวแมลงนั้น หลังจากนั้น ราที่เป็นปรสิตนี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จนสามารถเข้าไปแทนที่อยู่ในลำตัวของแมลงนั้นทั้งตัว และกลายเป็นกลุ่มเส้นใยของรา หรือไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยของราแมลงเมื่อเจริญเติบโตรวมตัวกัน เกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่เป็นดอกเห็ด มีรูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นก้านสปอร์ราที่เหมือนกิ่งไม้ หรือเหมือนตาข่ายคลุมตัวแมลง ก้านสปอร์นี้พร้อมที่จะกระจายไปตกบนแมลงเป้าหมายตัวต่อไป ดังภาพที่ 2.2

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดถั่งเช่ามีหลายชนิดด้วยกัน ตัวอย่างดังแสดงภาพที่ 2.3 เห็ดถั่งเช่าที่มีชื่อเสียงมากที่สุด คือ เห็ดถั่งเช่าทิเบตหรือเห็ดถั่งเช่าแท้ (*Ophiocordyceps sinensis* หรือชื่อเดิม *Cordyceps sinensis*) ในภาษาจีนจะเรียกว่า "ตังถั่งเช่า หรือ ตังถั่งเฉ้า" หากเรียกว่า "ถั่งเช่า หรือ ถั่งเฉ้า" อาจเป็นเห็ดถั่งเช่าสีทอง เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี (*Isaria tenuipes* หรือ *Isaria japonica*) หรือตัวอื่นๆ ได้

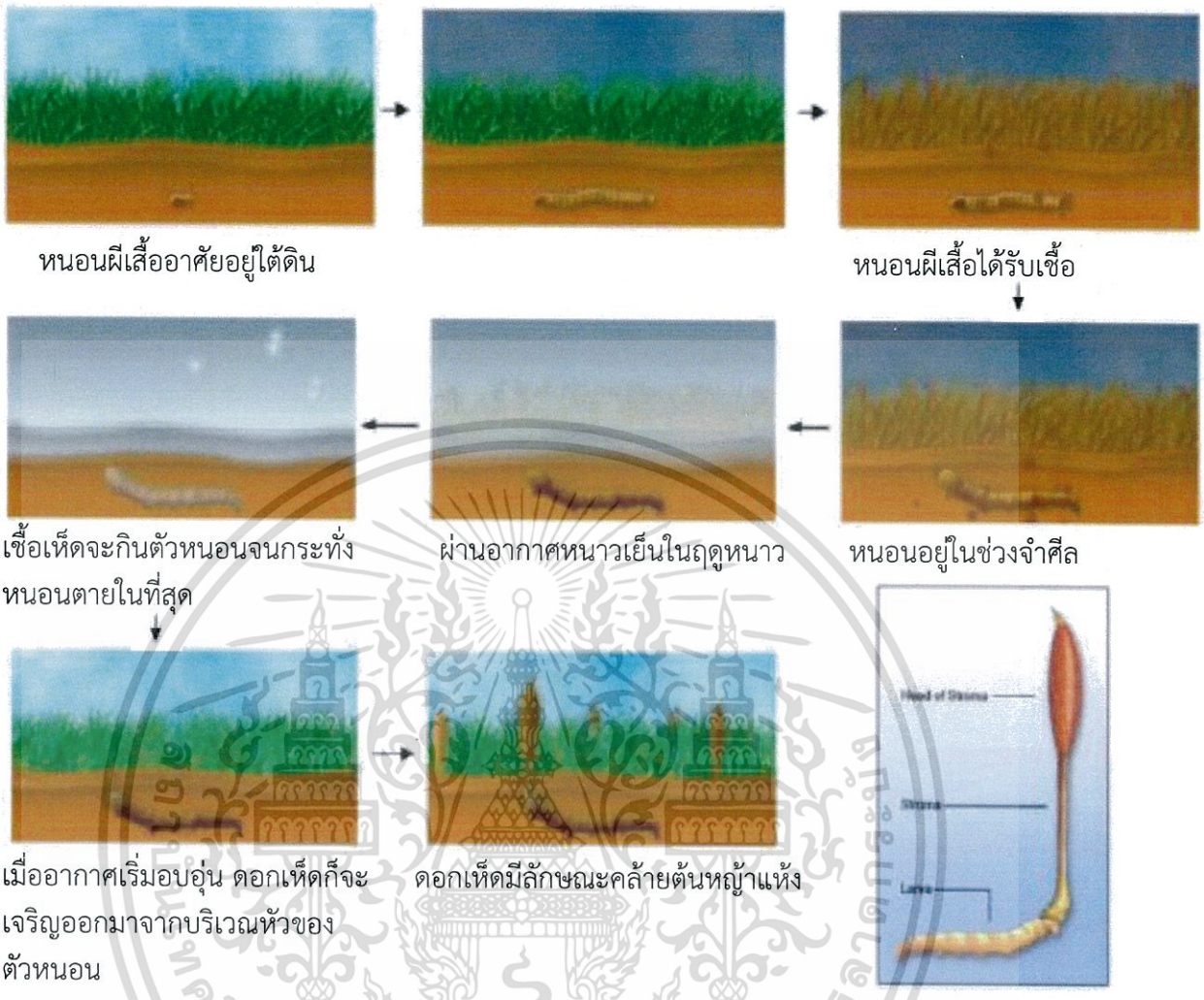
ถั่งเช่าได้ถูกขนานนามว่าเป็นยาอายุวัฒนะเนื่องจากมีสรรพคุณรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง บำรุงไต บำรุงปอด ฯลฯ ทั้งนี้เพราะมีสารประกอบหลายอย่าง โดยเฉพาะสาร คอร์ไดเซปิน (cordycepin) สารพอลิแซคคาไรด์ (cordyceps polysaccharide) สารอะดีโนซีน (adenosine) และสารอื่นๆ ที่บำรุงเซลล์ส่งผลให้เซลล์แข็งแรงทำให้ร่างกายแข็งแรง



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอร์ไดเซปินและกรดคอร์ไดเซปิก
ที่มา : Lee และคณะ (2009)

เมื่อปี 2543 ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปราโมทย์ ไทยทัตกุล (2543) ได้เขียนบทความเกี่ยวกับเห็ดถั่งเช่าว่าเป็นเห็ดที่น่าสนใจและอาจเพาะเลี้ยงได้ในเมืองไทยต่อมาปี 2546 ธวัช ทะพิงค์แก ได้นำถั่งเช่าธิเบตที่เพาะได้ไปวางแสดงที่งานประชุม Thai-Japanese Mini-Symposiumon Macrofungi จัดที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ต้นปี 2553 สมยศ กิตติมั่นคง ได้เสนอข่าวเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าและสรรพคุณที่มีฤทธิ์เพิ่มสมรรถนะทางเพศทำให้เห็ดถั่งเช่าเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น ปีเดียวกันนั้นนักวิจัยนำเสนอผลงานวิจัยการเพาะเห็ดถั่งเช่าด้วยเทคนิคและอุปกรณ์แบบง่าย ที่งานประชุมวิชาการของสมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยมีผู้สนใจอย่างมากมาย ต่อมาทางสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ได้เปิดอบรมการเพาะเห็ดถั่งเช่า ซึ่งจัดว่าเป็นแห่งแรกในประเทศไทยที่สอนวิธีการเพาะเห็ดถั่งเช่าโดยทีมวิจัยของคณะเทคโนโลยีการเกษตร ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าตลอดจนการไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านเป็นอาหารเสริมของคน และสัตว์ ได้นำองค์ความรู้จากการวิจัยมาใช้ในการเรียนการสอน และบริการวิชาการสู่สังคม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าธิเบต
ที่มา: ดัดแปลงจาก Asia Herbal Biotech (2009)

ภาพที่ 2.3 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ
ที่มา Zhou และคณะ 2009

2.2 สรรพคุณของสารสำคัญในถั่งเช่า

2.2.1 คอร์ไดเซปิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารเฉพาะตัวของเห็ดถั่งเช่าที่เพิ่มประสิทธิภาพในระบบการไหลเวียนเลือด ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค มีฤทธิ์บำรุงไต เพิ่มประสิทธิภาพการไหลเวียนของโลหิต

Tuli และคณะ (2013) สารคอร์ไดเซปินหรือรู้จักกันในชื่อ 3'-ดีออกซีอะดีโนซีน (9-(3-ดีออกซี-β-ดี-ไรโบฟูราโนซิว) อะดีนีน) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_{10}H_{13}N_5O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 251.24 มีคุณสมบัติเป็นเบส รูปร่างคล้ายเข็มหรือเกล็ดคริสตัล มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 228-231 องศาเซลเซียส สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ที่มีโครงสร้างคล้ายอะดีโนซีน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารคอร์ไดเซปินประกอบด้วยพิวรีน (อะดีนีน) กับโมเลกุลของนิวคลีโอไซด์ประกอบด้วยน้ำตาลไรโบส (ไรโบฟูราโนส) เชื่อมกันพันธะ β-N9-ไกลโคซิดิก การสังเคราะห์ทางเคมีของสารคอร์ไดเซปินส่วนใหญ่มาจากการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 3 ในโมเลกุลของไรโบฟูราโนซิลด้วยไฮโดรเจน ซึ่งเป็นการนำออกซิเจนออกจากอนุพันธ์ของอะดีโนซีน สารคอร์ไดเซปินสามารถประพฤติตัวเป็นเดนเทตลิแกนด์ (dentate ligand) ได้ 4 ตำแหน่ง เนื่องจากอะตอมของไนโตรเจนตำแหน่งที่ 5 และออกซิเจนตำแหน่งที่ 3 สามารถจับกับโลหะทรานซิชันได้ โครงสร้างที่แตกต่างกันตรงตำแหน่งที่ 3 ของสารคอร์ไดเซปินที่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้โครงสร้าง และเป็นหมู่ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล เช่น การสังเคราะห์พิวรีนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ การส่งสัญญาณของโปรตีน mTOR (mammalian target of rapamycin) ที่เกี่ยวข้องกับการยังยั้งเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้สารคอร์ไดเซปินยังยับยั้งวัฏจักรเซลล์อะพ็อพโตซีส (apoptosis) ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดในเซลล์มะเร็ง และเป็นสารสื่อกลางในการอักเสบของวิถี ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 2.4

Rao และคณะ (2006) สารคอร์ไดเซปินเป็นสารที่ใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาเมแทบอลิซึมของอาร์เอ็นเอในยูคาริโอตเซลล์ ซึ่งกระบวนการเมแทบอลิซึมจะใช้อธิบายในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ใหม่ของพิวรีน การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีน และรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของอาร์เอ็นเอ นอกจากนี้สารคอร์ไดเซปินยังต้านเชื้อรา ป้องกันมะเร็งเม็ดเลือดขาว ต้านเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium* เป็นสารฆ่าแมลง ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ของโปรตีนใหม่ในไวรัส และเป็นสารยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

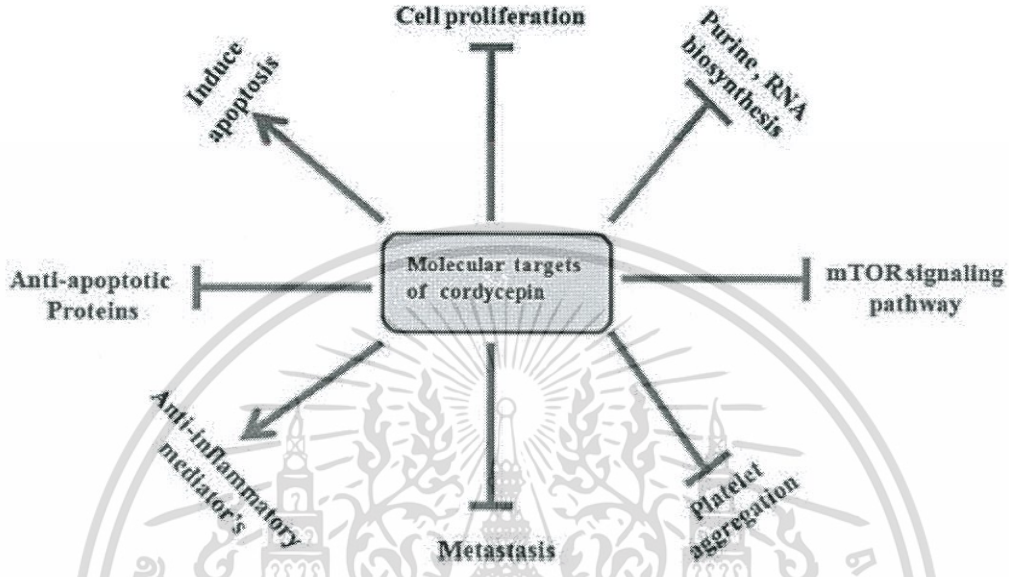
Lee และคณะ (2009) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารคอร์ไดเซปิน ในการยับยั้งผลกระทบจากแสงแดดที่มีต่อผิว ทำให้ผิวเสีย (anti-skinphotoaging effects) ในห้องปฏิบัติการโดยทำการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีอยู่ในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ได้แก่ metalloproteinase-1 (MMP-1) และ metalloproteinase-3 (MMP-3) ผลการทดลองพบว่าสารคอร์ไดเซปินสามารถป้องกัน (block) รังสี UVB ไม่ให้เหนี่ยวนำการสร้าง MMP จึงสามารถป้องกันการเสื่อมของผิวหนังจากรังสีอัลตร้าไวโอเล็ตที่มีในแสงแดดได้

Chen และคณะ (2010) ทำการศึกษาศักยภาพของสารคอร์ไดเซปินจากเห็ดถั่งเช่าในการเหนี่ยวนำ ทำให้เซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ (CGTH W-2) ตาย ซึ่งผลปรากฏว่าเซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ลดความสามารถในการมีชีวิตต่อไปและตายในที่สุดโดยไม่กลายเป็นเนื้อร้าย

Kim และคณะ (2011) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารคอร์ไดเซปินในหนูทดลองขัดขวางการตอบสนองต่อการอักเสบเฉียบพลันในปอด (Acute lung inflammatory; ALI) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง รวมถึงโมเลกุลยึดเกาะ (Intercellular adhesion molecule; ICAM และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vascular cell adhesion molecule; VCAM) ไซโทไคน์/เคโมไคน์และเคโมไคน์รีเซพเตอร์ CXCR2 การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารคอร์ไดเซปินขัดขวางลิโพพอลิแซคคาไรด์ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิด VCAM ในเซลล์ A549 โดยการลดลงใน p65-NF-kB ซึ่งมีผลเชื่อมโยงโดยตรงต่อ poly (adenosine diphosphate–ribose) polymerase (PARP) inhibition



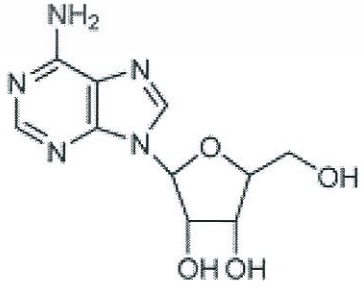
ภาพที่ 2.4 รูปแสดงความสัมพันธ์ของสารคอร์ไดเซปินในกระบวนการทางชีวเคมี รวมถึงกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การรวมตัวของเกล็ดเลือด การแพร่กระจาย การต่อต้านการอักเสบเซลล์อะพอพโตซีส และวิถีการส่งสัญญาณของเซลล์

ที่มา: Tuli และคณะ (2013)

2.2.2 อะดีโนซีน

บทบาทของอะดีโนซีน คือ ช่วยต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านการเกิดลิ่มเลือด

Ling และคณะ (2009) สารอะดีโนซีนมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวกลางในสารสื่อประสาท แสดงดังภาพที่ 2.5 และมีส่วนเกี่ยวข้องในระบบสรีรวิทยา เช่น ควบคุมอารมณ์และการนอนหลับ การตื่นตัวและระบบความจำ ใน C_6 ของเซลล์เนื้องอกสมอง สารอะดีโนซีนขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในปริมาณและเวลาที่กำหนด



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของอะดีโนซีน

ที่มา: Ling และคณะ (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณ (มิลลิกรัม/กรัม) ของสารประกอบในเห็ดถั่งเช่าที่ได้จากวิธีการเพาะและแหล่งที่มาแตกต่างกัน

Marker	ถั่งเช่าธิเบต (ธรรมชาติ)		ถั่งเช่าธิเบต (เพาะ)				ถั่งเช่าสีทอง (เพาะ)	
	ชิงไห่	ธิเบต	เจียงซี	Huadong	Wanfong	Boding	จี๋หนิง	Oli
Ergosterol	3.65	10.34	1.31	1.10	0.38	0.95	6.33	ไม่มีข้อมูล
Adenosine	0.31	0.25	3.23	2.31	5.09	2.16	0.86	0.22
Cordycepin	0.04	0.06	ไม่สามารถตรวจพบ			ต่ำกว่าเกณฑ์	9.22	5.71
Guanosine	0.20	0.18	2.80	1.82	4.45	2.55	0.69	0.17
Inosine	0.33	0.20	0.12	0.01	0.03	0.19	0.03	0.02
Uridine	0.66	0.83	3.11	1.54	8.14	1.93	1.96	0.51
Mannitol	38.64	35.42	10.24	12.83	13.41	11.21	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
Polysaccharides	4.75	8.22	5.83	7.51	5.96	3.84	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล

ที่มา Li และคณะ (2006)

Lei และคณะ (2009) ทำการทดลองหาสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในดอกเห็ดและเส้นใยของ *Cordyceps sinensis* และ *Cordyceps militaris* ที่มาจากธรรมชาติและการเพาะเลี้ยง ด้วยวิธี HPLC พบว่าในดอกเห็ด *Cordyceps militaris* มีค่าของสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนเท่ากับ 2.654 ± 0.02 และ 2.45 ± 0.03 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ ส่วนใน *Cordyceps sinensis* มีค่าของสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนเท่ากับ 0.9801 ± 0.01 และ 1.643 ± 0.03 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในดอกเห็ด *Cordyceps militaris* มีค่าของสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงกว่า *Cordyceps sinensis* ที่มาจากธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเส้นใยที่ได้จาก *Cordyceps militaris* ไม่มีความแตกต่างจาก *Cordyceps sinensis* ที่มาจากธรรมชาติ

2.3 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตถั่งเช่าธิเบตในสภาวะอาหารเหลว

2.3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

Jong และคณะ (2013) ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวมวลของเส้นใย และสร้างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดย *Paecilomyces japonica* โดยทำการตรวจสอบผลขององค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และตัวแปรทางกายภาพ แหล่งสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของเซลล์และการสังเคราะห์สาร ส่วนประกอบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อผลผลิตของการหมักผลิตภัณฑ์ ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์คือเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะผลิตชีวมวลสูงสุด ของเส้นใยและเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ โดย *P. japonica* ทำการทดลองโดยเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหาร YMP เป็นเวลา 3 วัน และนำหัวเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงในอาหาร YMK โดยใส่หัวเชื้อร้อยละ 2 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วันที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และเขย่า 200 รอบ/นาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร อัตราในการให้อากาศเท่ากับ 0.5-1.5 (ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) และความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 100-500 รอบ/นาที หลังจาก 7-8 วันของการเพาะเลี้ยง นำอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นสามครั้ง และทำให้แห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 60 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเตรียมโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอล จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร และทำให้แห้งในเตาอบแห้งเพื่อให้น้ำหนักคงที่ น้ำหนักแห้งของเส้นใยและเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์วัดโดยการลบน้ำหนักแห้งของกระดาษกรองจากน้ำหนักรวม กลูโคสที่ตกค้างในการเพาะลี้ยงตรวจสอบโดยใช้ชุดทดสอบน้ำตาลกลูโคส และการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส ซึ่งพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ อุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่าง 15-33 องศาเซลเซียส แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นของเส้นใยในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ ของ *P. japonica* ความเข้มข้นของกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันคือ 10-80 กรัม/ลิตร และ 1-40 กรัม/ลิตร ตามลำดับ อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ตั้งแต่ 1-5 พบว่ามีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ นอกจากนี้อัตราส่วน ของคาร์บอนต่อไนโตรเจน ยังส่งผลให้การเจริญเติบโตของเส้นใยสูงและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สูง ตามลำดับ

ผลการทดลองที่ได้พบว่า สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วย *P. japonica* ได้ทำการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ และการเจริญเติบโตของเส้นใย จากการทดลองนี้พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด (เป็นกรัม/ลิตร) ประกอบด้วย กลูโคส 30 สารสกัดจากยีสต์ 20 KH_2PO_4 0.5 และ $CuCl_2$ $2H_2O$ 0.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมพบว่าอยู่ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าที่ 400 รอบต่อนาที และมีอัตราการเติมอากาศที่ 1.0 (ปริมาตร/ปริมาตร/นาที) โดยไม่ได้ควบคุมค่า pH เริ่มต้น การเจริญเติบโตสูงสุดของเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ เป็น 23.1 และ 2.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

2.3.2 สภาวะการหมักที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่า

Lan และคณะ (2015) ทดลองค่าพารามิเตอร์เดียวเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย เช่น ค่า pH เริ่มต้น อุณหภูมิ ความเร็วในการเขย่า ปริมาตรหัวเชื้อ และปริมาณของอาหาร ทำการทดลองโดยใช้อาหาร PDB แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุที่เหมาะสม อาหารสำหรับใช้ในการทดสอบคืออาหารพื้นฐาน (เป็นกรัมต่อลิตร) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 20 เปปโตน 2 KH_2PO_4 1.5 $MgCl_2$ 1.0 KCl 0.1 และ $CaCl_2$ 0.5

นอกจากนี้หลักสำคัญของการทดลองค่าพารามิเตอร์เดียว ได้มีการนำ orthogonal experiment L_{25} (5^6) มาใช้เพื่อประเมินผลกระทบของการรวมกันของทั้งหกพารามิเตอร์ ในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมไปถึงค่าตัวแปรที่เป็นอิสระของอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย รวมทั้ง กลูโคส ซูโครส สารสกัดจากยีสต์ KH_2PO_4 $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ ที่ห้าระดับในกระบวนการหมัก ผลของค่า pH เริ่มต้นของการเจริญของเส้นใย พบว่าในฟลาสก์ประกอบด้วยอาหาร PDB ที่มี pH เริ่มต้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ 4.0 ถึง 8.0 น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้สูงสุดได้จาก pH เริ่มต้นที่ 6.0 ที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ว่าเชื้อรา *Cordyceps* ต้องการสภาวะที่เป็นกรดอ่อนในระหว่างการเพาะเลี้ยง ค่า pH ที่เป็นกลางอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเซลล์ การดูดซึมของสารอาหารที่แตกต่างกัน และการสังเคราะห์ทางชีวภาพ นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมพบว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 15 ถึง 25 องศา-เซลเซียส ผลที่ได้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ UM01 คือ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงว่าอุณหภูมิต่ำเหมาะต่อการเจริญของเส้นใย UM01 มากที่สุด

ผลของความเร็วในการเขย่า (คือ 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที) ในการเจริญของเส้นใย การเขย่าเป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับสารตั้งต้น ความร้อนและการถ่ายเทออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) และจะเพิ่มแรงเชียร์ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยังมีผลที่สำคัญต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์ มวลชีวภาพของ UM01 เพิ่มขึ้นด้วยการเพิ่มขึ้นของความเร็วในการหมุน (100-150 รอบ/นาที) อย่างไรก็ตามผลผลิตของเส้นใยจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเร็วในการหมุน 200 รอบ/นาที ซึ่งอาจเกิดผลเชิงลบของแรงเชียร์ที่เพิ่มขึ้นต่อการรวมกลุ่มของเส้นใย

นอกจากนี้เพื่อให้ได้ปริมาตรของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุด และปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเส้นใย UM01 ที่เจริญด้วยปริมาณหัวเชื้อที่แตกต่างกัน (คือ ร้อยละ 1, 3 และ 5 ปริมาตร/ปริมาตร) และปริมาณอาหาร (คือ 3/10, 2/5 และ 5/10 ปริมาตร/ปริมาตร) ผลที่ได้พบว่าปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 3 และปริมาณอาหารที่เหมาะสมคือ 2/5 ปริมาตร/ปริมาตร โดยให้ปริมาณน้ำหนักแห้งสูงสุดของเส้นใย (22.86 กรัม/ลิตร) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก โดยใช้อาหาร PDB อย่างไรก็ตามส่วนประกอบของอาหาร PDB ไม่สามารถควบคุมได้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงแหล่งที่มาของมันฝรั่ง ดังนั้นในการควบคุมการหมักอาหารเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเส้นใย พบว่าการหมักอาหารที่เหมาะสมจะใช้อาหาร (เป็นกรัม/ลิตร) ประกอบด้วย กลูโคส 20 เปปโตน 2 KH_2PO_4 1.5 $MgCl_2$ 1.0 KCl 0.1 และ $CaCl_2$ 0.5

Chen และคณะ (2015) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps sinensis* Cs-HK1 ที่แยกได้ก่อนหน้านี้จากดอกเห็ดของ *Cordyceps sinensis* ตามธรรมชาติและ stock culture เก็บไว้ในอาหาร solid potato–dextrose–agar ที่ 4 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* Cs-HK1 ในอาหารเหลว (เป็นกรัมต่อลิตร) ที่ประกอบด้วย กลูโคส 40 ยีสต์สกัด 10 เปปโตน 5 KH_2PO_4 1.0 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 ในขวดเขย่าที่ความเร็วรอบที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำในขวดปริมาตรทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ละขวดประกอบไปด้วยอาหารเหลว 50 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 8 วัน ในแต่ละวันจะนำออกมา 3 ฟลาสก์ ออกจากเครื่องเขย่า ในวันที่ 8 พบการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากน้ำตาลสามประเภท (Glc+Gal, Glc, Glc+Man) เท่ากับ 2.9, 2.8 และ 2.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Jang และคณะ (2010) ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และเวลาสำหรับการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์และกลูโคซามีน จากเห็ดถั่งเช่า *Cordyceps sinensis* ในการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนทั้งหมด 7 แหล่ง ได้แก่ เดกซ์โทรส ซูโครส รำข้าว แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง ซอร์บิทอล และกากน้ำตาล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพราะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าแป้งข้าวโพด ผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกากน้ำตาล ผลิตกลูโคซามีนได้สูงสุดเท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตถั่งเช่าธิเบตในสภาวะอาหารแข็ง

2.4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

Choi และคณะ (2010) ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และย้ายเชื้อทุก 3 เดือน ซึ่งอาหารประกอบด้วย เดกซ์โทรส (30 กรัม) เปปโตน (8 กรัม) KH_2PO_4 (1 กรัม) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 กรัม) และปรับค่าพีเอชให้เป็น 5.5 เพาะเลี้ยงใน ฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลังจากเจริญได้ร้อยละ 3 (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การหมักของอาหารเป็นการเจริญขึ้นร้อยละ 2 (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อการเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ผลของแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์พบว่าการเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการหมัก *Cordyceps sinensis* และมีจำนวนของแหล่งคาร์บอนที่ถูกเลือกทั้งหมด 7 แหล่ง (เดกซ์โทรส ซูโครส รำข้าว แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง ซอร์บิทอลและกากน้ำตาล) เพิ่มความเข้มข้นสุดท้ายให้ได้ร้อยละ 2 ในอาหารเริ่มต้นและเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5 วัน ตามลำดับ พบว่า เมื่อเพิ่มกากน้ำตาลมีผลทำให้ปริมาณกลูโคซามีนมีปริมาณสูงที่สุด (25.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในเส้นใย และเมื่อเพิ่มแป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่งและรำข้าว พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนสูงตามลำดับ สูงสุด (19.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ประสบความสำเร็จโดยการเติมรำข้าวและตามด้วยกากน้ำตาล (14.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และแป้งมันฝรั่ง (12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

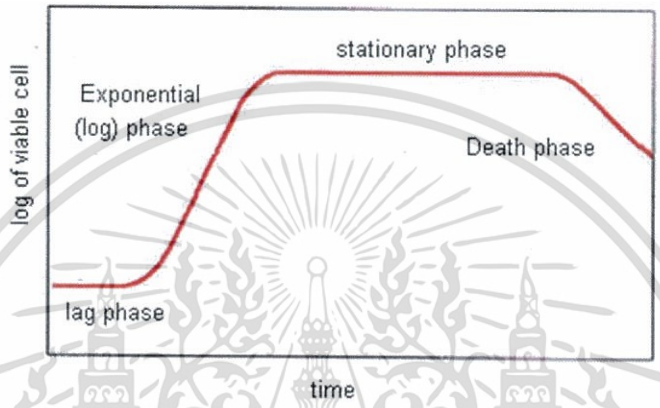
จากผลดังกล่าวข้างต้น เราจะคัดเลือกต่อไปโดยใช้ผลต่อการเพิ่ม โดยใช้อัตราส่วนต่างๆของกากน้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตสูงสุดของเส้นใยและรำข้าวสำหรับการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ปริมาณกลูโคซามีนสูงโดยใช้อัตราส่วน 4:0 ของรำข้าวต่อกากน้ำตาล (133.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) หรือใช้อัตราส่วน 4:0 ของกากน้ำตาลต่อรำข้าว (139.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ต่อไปเป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้น เมื่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ทดสอบโดยการเปลี่ยนอัตราส่วน 3:1, 4:0 และ 0:4 อัตราส่วนของรำข้าวต่อกากน้ำตาลจะส่งผลให้ได้ค่าสูงสุด 29.3, 24.8 และ 13.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลของแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ พบว่าผลของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณกลูโคซามีน ได้ศึกษาโดยการเติมยีสต์สกัดไปร้อยละ 0.5-4 และ CSL ในอาหารพื้นฐานเสริมมีอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน (รำข้าว:กากน้ำตาล = 3:1) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด ค่าพีเอชแตกต่างกัน 4.99-7.13 และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (ที่ไม่ได้แสดงข้อมูล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่า ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเมื่อยีสต์สกัดร้อยละ 2-4 (139.5-141.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ CSL ร้อยละ 3-4 (116.5-138.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) มีการเพิ่มในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์คล้ายคลึงกับรูปแบบที่แสดงของยีสต์สกัดและ CSL ดังนั้น CSL อาจจะเป็นแหล่งไนโตรเจนทางเลือกสำหรับการเพิ่มปริมาณกลูโคซามีนและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สำหรับการผลิตชีวมวลเมื่อราคาอาหารได้นำมาพิจารณาร่วมด้วย

2.5 อัตราการเจริญของจุลินทรีย์



ภาพที่ 2.6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generation-time

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่แบคทีเรียเริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับอาหาร และสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย และพร้อมที่จะแบ่งตัว ระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแปรรูปอาหารจะพยายามยืดช่วงนี้ไปให้ยาวนานที่สุด เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ (cold storage)

2. Exponential หรือ log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีอัตราการแบ่งตัวคงที่ ส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และกระบวนการต่างๆ ตลอดจนสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก หรือคืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่แบคทีเรียเจริญแล้วเข้าสู่ระยะ stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดลง แบคทีเรียจึงเจริญช้าลง นอกจากนี้ ของเสียที่แบคทีเรียสร้างขึ้นยังยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Death phase หรือ decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย แบคทีเรียที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมด และมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมาก

Xiao และคณะ (2015) ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า *Cordyceps miitaris* SN-18 ในอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (ที่ประกอบด้วยมันฝรั่งร้อยละ 1 และเดกโทสร้อยละ 2) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

2.6 การผลิตชีวมวลของเส้นใย โดยการหมักในสภาวะต่างๆ

Kim และ Yun (2005) ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหารที่ประกอบด้วย ซูโครส 20 กรัม corn steep powder 25 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.78 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรด ($MgSO_4 .7H_2O$) 1.73 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงในถังกวน (Stirred-tank) ขนาด 5 ลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2 ปริมาตร/ปริมาตร/นาที ความเร็วในการกวนคือ 150 รอบ/นาที ที่พีเอช เท่ากับ 4.0 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน จะได้ชีวมวลของเส้นใยเท่ากับ 20.9 กรัม/ลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 4.1 กรัม/ลิตร

Wu และคณะ (2009) ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหารที่ประกอบด้วย ซูโครส 20 กรัม ยีสต์สกัด 2.0 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) 1.0 กรัม และแมกเนเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรด 1.73 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ที่เขย่า (shake flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ลิตร/นาที ความเร็วในการกวนคือ 130 รอบ/นาที ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จะได้ชีวมวลของเส้นใยเท่ากับ 12.3 กรัม/ลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 24.5 กรัม/ลิตร

Yin และคณะ (2013) ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 30 กรัม เปปโตน 15 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 3.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรด 1.73 กรัม และมันฝรั่ง 200 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ชีวมวลของเส้นใยเท่ากับ 25.0 กรัม/ลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 2.8 กรัม/ลิตร

Leung และคณะ (2006), Leung และ Wu (2007) ได้ทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* Cs-HK1 ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 40 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 1.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรด 0.5 กรัม และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 10 มิลลิโมล ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่า ที่มีความเร็วในการเขย่า 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะได้ชีวมวลของเส้นใยเท่ากับ 23.2 กรัม/ลิตร และมีค่าผลได้เท่ากับ 3.4 กรัม/ลิตร

Dong และ Yao (2005) ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* 762 ในอาหารที่ประกอบด้วย ซูโครส 50 กรัม เปปโตน 10 กรัม และยีสต์สกัด 3 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่า ที่ความเร็วในการกวน 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วัน จะได้ชีวมวลของเส้นใยเท่ากับ 22.1 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lang และคณะ (2009) ได้ทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* 383 ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 30 กรัม bean cake 20 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$) 2.0 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 4.0 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เลี้ยงใน Rotary shaker ที่ความเร็วในการกวน 140 รอบ/นาที ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน มีค่าผลได้เท่ากับ 3.9 กรัม/ลิตร

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการสารสำคัญในเส้นใยของเห็ดถั่งเช่า

Junqiao และคณะ (2015) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าธิเบต (*Cordyceps sinensis*) จากธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงเส้นใย จากนั้นทำการเปรียบเทียบการต้านอนุมูลอิสระจากการสกัดด้วยน้ำ โดยสารสกัดไขมันหยาบและกรดอะมิโนทั้งหมด มีนัยสำคัญสูงในตัวอย่างการเพาะเลี้ยง พบว่ากรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนที่มีมากที่สุดในทุกตัวอย่าง อาร์จินีนเป็นสารสำคัญตัวที่สองของกรดอะมิโนในกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ ในขณะที่ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงมีปริมาณของกรด แอสพาร์ติก (aspartic) และลิวซีน (leucine) เป็นจำนวนมาก สารเกี่ยวกับแร่ธาตุ ยกเว้น Cr, Mo, SN, V และ Cd มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ และตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยง สารที่ได้จากแมนนิทอลในตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติอย่างมีระดับนัยสำคัญ มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 9.85 ถึงร้อยละ 11.51 ในขณะที่เส้นใยมีค่าน้อยกว่าครึ่งหนึ่ง ในทางตรงกันข้ามปริมาณของพอลิแซคคาไรด์ อะดีนีน และอะดีโนซีน ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีจำนวนร้อยละ 10.43 0.50 มิลลิกรัม/กรัม และ 2.61 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับซึ่งสูงกว่าตัวอย่างที่ได้จากธรรมชาติ คอร์ไดเซปินตรวจไม่พบในทั้งสี่ตัวอย่าง

Li และคณะ (2015) ทำการศึกษาวัตถุประสงค์วิธีการใช้ HPLC ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารอะดีโนซีน และคอร์ไดเซปิน โดยใช้ความร้อนกับเห็ดถั่งเช่าสีทอง *Cordyceps militaris* ในการใช้ HPLC เฟสเคลื่อนที่ใช้ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำบริสุทธิ์ (16:84) ใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์เป็น 27 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ตรวจจับด้วยรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ผลที่ได้คือ มีค่าเฉลี่ยที่ได้ของอะดิโนซีนเท่ากับร้อยละ 113.6 และคอร์ไดเซปินเท่ากับร้อยละ 108.4 โดยสารอะดีโนซีนใน *Cordyceps militaris* ลดลงเป็นจำนวนมากหลังจากที่นึ่งด้วยไอน้ำ อย่างไรก็ตามสารคอร์ไดเซปินค่อนข้างมีความเสถียร

Ing-Lung และคณะ (2007) ทำการทดลองผลของค่าพีเอชเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน น้ำมันพืช และรูปแบบของการเพาะเลี้ยง (ฟลาสก์ที่เขย่าและฟลาสก์ที่ไม่ได้เขย่า) ในการผลิตชีวมวล เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) อะดีโนซีน และโดยเฉพาะสารคอร์ไดเซปิน ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris* CCRC 32219) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใย การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์และสารคอร์ไดเซปิน พบว่าอยู่ที่พีเอชค่อนข้างต่ำ แหล่งสารอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีสต์ เหมาะสมสำหรับผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์และสารคอร์ไดเซปิน ในขณะที่ผงข้าวโพด เหมาะสมสำหรับการผลิตอะดีโนซีน อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำเหมาะสมสำหรับการผลิตอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน แต่ถ้าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำมากก็จะทำให้การผลิตอะดีโนซีนแลคอร์ไดเซปินลดน้อยลง น้ำมันพืชที่ทดสอบทั้งหมดส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ไม่มีผลกับการผลิตอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน ในกระบวนการหมักทั้งสองแบบ โดยการหมักด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าและการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในการผลิตคอร์ไดเซปิน การออกแบบการทดลองของ Box-Behnken ทำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของคอร์ไดเซปิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอไดเซปินจาก *C. militaris* CCRC 32219 มีค่าพีเอชเท่ากับ 6 สารสกัดจากยีสต์ 45 กรัม/ลิตร และใช้เวลา 8 วันสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า และใช้เวลา 16 วันสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถผลิตคอร์ไดเซปินได้สูงสุด (2,214.5 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งสูงกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้

2.8 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า (ธัญญา, 2555)

2.8.1 การเพาะเลี้ยงด้วยตัวหนอนหรือดักแด้

เป็นวิธีการเลียนแบบธรรมชาติ โดยทำการใส่เชื้อลงไปในหนอนสกุล *Thitarodes* (Hepialus) โดยที่หนอนยังมีชีวิตอยู่เมื่อหนอนได้รับเชื้อจะค่อยๆอ่อนแอและตายในที่สุด เห็ดจะงอกออกมาจากตัวหนอน หนอนที่ใช้เพาะเชื้ออาจเก็บมาจากธรรมชาติ โดยเก็บรังไหมมาแล้วทำการผ่าเอาดักแด้มาใช้หรืออาจทำการเก็บไข่ผีเสื้อมาทำการเพาะจนได้ดักแด้ การเพาะด้วยตัวหนอนทำได้ทั้งในสภาพปลอดเชื้อหรืออาจเพาะในโรงเรือนที่สะอาดสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในได้

2.8.2 การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร

เห็ดถั่งเช่าแต่ละชนิดต้องการอาหารที่ไม่เหมือนกันแต่สามารถเจริญบนอาหารสูตรพื้นฐานได้ การเจริญเติบโตจะให้ผลดีนั้นควรทำการเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเห็ดชนิดนั้นๆ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเป็นอาหารวิทยาศาสตร์ได้มาจากการผสมสารเคมีหลายๆชนิดหรืออาจเป็นวัตถุดิบตามธรรมชาติก็ได้ วัตถุดิบแต่ละชนิดที่นำมาทำอาหารเพาะเลี้ยงมีคุณค่าทางสารอาหารต่างกันสามารถแบ่งตามลักษณะของอาหารได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ

1. อาหารแข็งอาจเป็นวุ้นหรือเมล็ดธัญพืชก็ได้โดยนำหัวเชื้อเห็ดมาวางบนอาหาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-45 วัน โดยใน 2 สัปดาห์แรก บ่มในที่มืด จากนั้นให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มข้นของแสง 1,000-3,000 ลักซ์

2. อาหารเหลวโดยปกติในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ผลผลิตเห็ดถั่งเช่าจะเก็บลักษณะเป็นเส้นใย การเพาะด้วยอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้เทคนิคพิเศษในการเพาะเลี้ยง เช่น การเลี้ยงแบบเขย่า (Shaking culture) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged culture) การเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว (Surface liquid culture) และการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (Continuous culture หรือ Repeated batch culture) เทคนิคการเลี้ยงแบบเขย่า ทำได้โดยตัดหัวเชื้อเห็ดที่ขึ้นบนอาหารวุ้นด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 5 ตารางมิลลิเมตร นำไปใส่ลงในขวดชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ 50-100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส โดยวางบนเครื่องเขย่า ตั้งความเร็วที่ 50-150 รอบ/นาที ประมาณ 5-7 วัน จากนั้นนำเชื้อมาใช้ได้

เห็ดถั่งเช่าที่เลี้ยงในอาหารเหลว สามารถเก็บผลผลิตโดยการกรองเอาเส้นใยเห็ด หากเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเหลวจะสามารถเก็บผลผลิตเห็ดเป็นลักษณะแผ่นเส้นใยเห็ด หลังจากเก็บผลผลิตแล้วจะนำมาทำให้แห้งโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ธัญญา, 2555)

Chunyan และคณะ (2009) พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) กับการเลี้ยงบนอาหารเหลว (liquid-state fermentation) แล้วการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวจะใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงที่สั้นกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 การเพาะด้วยอาหารจากธรรมชาติ

2.8.3.1 ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)

ข้าวกล้องชนิดนี้ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ลักษณะเป็นข้าวเจ้าสีม่วงเข้ม รูปร่างเมล็ดเรียวยาว ข้าวกล้องมีความนุ่มนวลมาก ปลูกได้ตลอดทั้งปี ให้ผลผลิตต่อไร่ปานกลาง ต้านทานต่อโรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานโรคหลาว จึงควรเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ทุกรอบการปลูกอีกข้อจำกัดคือเป็นข้าวที่ต้องการเอาใจใส่เป็นพิเศษ โดยปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ และต้องมีสภาพอากาศเย็น เพื่อสร้างสีเมล็ดลักษณะประจำพันธุ์ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ความสูง 105-110 เซนติเมตร อายุเก็บเกี่ยว 130 วัน ผลผลิต 300-500 กิโลกรัม/ไร่ ข้าวกล้อง (brown rice) ร้อยละ76 ต้นข้าวหรือข้าวเต็มเมล็ด (head rice) ร้อยละ 50 ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก 11 มิลลิเมตร ข้าวกล้อง 7.5 มิลลิเมตรข้าวขัด 7.0 มิลลิเมตร ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว โดยความร่วมมือจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พันธุ์ข้าวนี้ได้จดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชใหม่แล้ว ห้ามนำไปขยายพันธุ์เชิงการค้าต่อ โดยไม่ได้รับอนุญาตจาก วช. และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการ คือมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอี แทนนิน สังกะสี และโฟเลตสูง มีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง นอกจากนี้รำข้าวและน้ำมันรำข้าว ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งจากคุณสมบัติข้อนี้ นอกจากจะใช้รับประทานเพื่อเสริมสร้างสุขภาพที่ดี ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง ทางการแพทย์ยังนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารโภชนาบำบัดอีกด้วย สารอาหารสำคัญที่อยู่ในข้าวกล้องไรซ์เบอรี่ ประกอบด้วยโอเมก้า 3 มีอยู่ 25.51 มิลลิกรัม/กิโลกรัม กรดไขมันจำเป็น มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของสมอง ตับและระบบประสาท ลดระดับคอเรสเตอรอล ธาตุสังกะสี 31.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยสังเคราะห์โปรตีน สร้างคอลลาเจน รักษาสิว ป้องกันผมร่วง กระตุ้นรากผม มีธาตุเหล็ก 13-18 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สร้างและจ่ายพลังงานในร่างกาย เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในร่างกายและสมอง วิตามินอี 678 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ชะลอความแก่ ผิวพรรณสดใส ลดอัตราเสี่ยงของโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดสมองและหัวใจ ทำให้ปอดทำงานดีขึ้น วิตามินบี 1 มีอยู่ 0.42 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จำเป็นต่อการทำงานของสมอง ระบบประสาท ระบบย่อย ป้องกันโรคเหน็บชา เบต้าแคโรทีน (สารตั้งต้นของวิตามินเอ) 63 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ช่วยชะลอความแก่ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง บำรุงสายตา ลูทีน 84 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ป้องกันจอประสาทตาเสื่อม บำรุงการไหลเวียนของเลือดในเส้นเลือดฝอยที่หล่อเลี้ยงตา โพลิฟีนอล 113.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง แทนนิน 89.33 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แก้ท้องร่วง แก้บิด สมานแผล แผลเปื่อย แกมมา โอไรซานอล 462 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหลอดเลือด ทำให้เลือดหมุนเวียนไปเลี้ยงอวัยวะส่วนต่างๆ ได้อย่างเป็นปกติ ลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง สมองเสื่อม

นอกจากนี้ เส้นใยอาหาร (fiber) มีอยู่ปริมาณมากในข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ ช่วยลดระดับไขมันและคอเลสเตอรอล ป้องกันโรคหัวใจ ช่วยควบคุมน้ำหนัก ช่วยระบบขับถ่าย

2.8.3.2 ข้าวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยดมีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์ข้าวทั่วไป โดยปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้ง มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปนแดงอ่อนๆ ถึงแดงเข้ม เมล็ดเล็กเรียว ท้ายงอน มีขนาดยาว 6.70 มิลลิเมตร กว้าง 1.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

มิลลิเมตร หนา 1.64 มิลลิเมตร สามารถต้านทานต่อโรค แมลง และศัตรูพืช รวมทั้งปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมได้ดี นิยมรับประทานแบบข้าวกล้อง ข้าวซ้อมมือ ซึ่งให้ประโยชน์มากกว่าข้าวกล้องและข้าวซ้อมมือทั่วไป

ข้าวสังข์หยดมีคุณค่าทางโภชนาการมากมาย มีกากใย โปรตีน ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กสูง มีแกมมาออไรซานอล กาบา แอนตี้ออกซิแดนท์ป้องกันมะเร็ง ช่วยชะลอความแก่ ป้องกันความจำเสื่อม บำรุงโลหิต โรคหัวใจ และเพราะมีกากใยสูงจึงดีต่อระบบขับถ่ายและลำไส้ มีไนอาซินสูง ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบผิวหนังและประสาท ถ้าขาดวิตามินนี้จะทำให้เกิดโรค “Pellagra” (ทำให้มีอาการผิดปกติทางระบบประสาทความจำเสื่อม ทำให้ผิวหนังที่ถูกแสงแดดจะอักเสบเป็นผื่นแดงและลอก) ประโยชน์ทางโภชนาการข้าวสังข์หยด คือ ปริมาณอะไมโลสร้อยละ 14.25 ปริมาณโปรตีนในข้าวกล้องร้อยละ 7.65

2.9 วิธีการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าธิเบตโดยการใช้ (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

มนุษย์ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแยกสารที่มีสีออกจากันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1906 และได้มีการพัฒนาเทคนิคดังกล่าวให้สามารถแยกสารต่าง ๆ ที่ไม่มีสีออกจากกันได้อีกหลายร้อยชนิด จนกระทั่งในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้มีการพัฒนามาเป็นเครื่องแยกสารวิเคราะห์สารในระบบกึ่งอัตโนมัติ หรือระบบอัตโนมัติที่มีประสิทธิภาพสูง ใช้งานง่าย และแยกสารหรือวิเคราะห์สารได้รวดเร็ว จึงนิยมนำไปตรวจวิเคราะห์สารทางห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์อย่างแพร่หลาย

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของข้าวสังข์หยดเทียบกับข้าวไรซ์เบอร์รี่

คุณค่าทางโภชนาการของข้าวสังข์หยดเทียบกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ในตัวอย่าง 100 กรัม)		
คุณค่าทางโภชนาการ	ข้าวสังข์หยด	ข้าวไรซ์เบอร์รี่
โปรตีน (กรัม)	73	-
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	73.1	-
เส้นใย (กรัม)	4.81	-
ธาตุเหล็ก (มิลลิกรัม)	1.4	13-18
สังกะสี (มิลลิกรัม)	-	3.19
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	13	-
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.32	-
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.01	0.42
ไนอะซิน (มิลลิกรัม)	6.4	-

ที่มา http://www.gotoknow.org/blogs/posts/389668. และ www.greenshopcafe.com › Green Story › Food. (28 พฤษภาคม 2559)

หลักการแยกสาร ของเหลวความดันสูงจะสร้างแรงพา (impelling force) ดันสารต่าง ๆ ในสารตัวอย่างผ่านไปบนตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ หรือเคลื่อนที่ได้เล็กน้อยที่เรียกว่า เฟสนิ่ง (stationary phase) ซึ่งเฟสนิ่งจะสร้างแรงหน่วง (retention force) ต่อสารชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

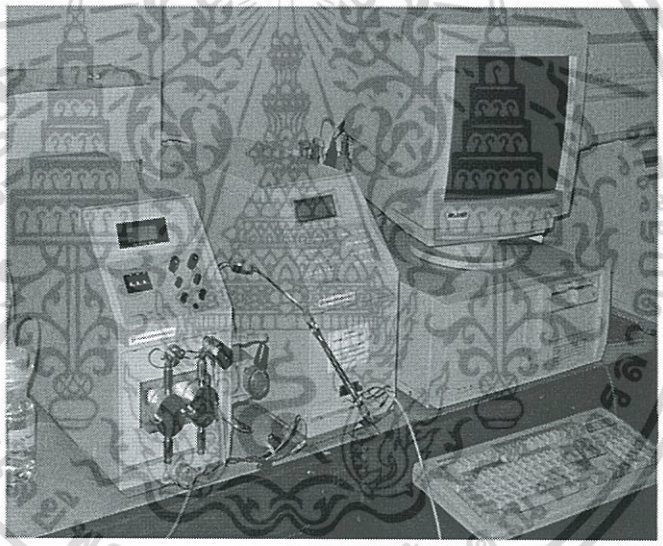
149283

กับ ขนาด รูปร่าง ประจุความจำเพาะ (specificity) การดูดซับ (adsorption) การละลาย (solubility) ดังนั้นความแตกต่างกันของแรงหน่วง จึงทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ซึ่งบรรจุเฟสนิ่ง ในเวลาหน่วง (retention time) ที่แตกต่างกัน

เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (ภาพที่ 2.7) บางครั้งเรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพราะเป็นเครื่องมือที่สามารถแยกสารและวิเคราะห์สารได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นจำนวนมาก มีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

1. เครื่องสูบ (pump) มีหน้าที่สูบของเหลวซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 0.5-10 มิลลิลิตร/นาที และรักษาให้คงที่ในช่วงอัตราเร็วช่วงใดช่วงหนึ่งโดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 2 ของปริมาตรที่สูบ สำหรับความดันสูงที่อัดเข้าไปในคอลัมน์จะมีค่าตั้งแต่ 1,000-6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เครื่องสูบที่นิยมใช้มีอยู่ 3 ชนิดคือ

1.1 ชนิดไซริงก์ (syringe type) นิยมใช้กับคอลัมน์ขนาดเล็ก เพราะมีขีดจำกัดในการดูดของเหลวปริมาตรมาก ๆ ควบคุมปริมาตรการสูบด้วยการควบคุมการเคลื่อนที่ของลูกสูบในไซริงก์โดยการหมุนของสกรูก้านลูกสูบซึ่งควบคุมด้วยจำนวนรอบของการหมุนของมอเตอร์



ภาพที่ 2.7 รูปร่างของเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง
ที่มา http://www.kmitl.ac.th/sisc/HPLC/Model.htm

1.2 ชนิดแทนที่ของเหลว (reciprocating piston type) ควบคุมปริมาตรโดยการควบคุมระยะชักของลูกสูบหรือควบคุมความเร็วของมอเตอร์ที่หมุนก้านลูกสูบ ซึ่งทำให้เครื่องสูบชนิดนี้สามารถดูดของเหลวในปริมาณมากได้ โดยการทำงานในระยะชักลูกสูบจะดูดของเหลวจากตัวเก็บสารละลายเข้ามาในกระบอกสูบ และปล่อยสารละลายเข้าไปในคอลัมน์ในระยะอัดของลูกสูบ และทำงานเป็นวงรอบต่อเนื่องกันไปจนกว่าจะปิดเครื่องสูบ

1.3 ชนิดความดันคงที่ (constant pressure pump) ควบคุมการไหลของของเหลวเข้าสู่คอลัมน์โดยการใช้ความดันของแก๊สเฉื่อยที่คงที่ดันให้ของเหลวไหลไปในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ตัวฉีด (injector) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ควบคุมปริมาตรของสารตัวอย่างที่ไหลเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 0.5-10 ไมโครลิตร สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.1 ชนิดไซริงก์ เป็นชนิดที่ใช้ไซริงก์ขนาดเล็กดูดสารตัวอย่างตามปริมาตรที่ต้องการ ฉีดผ่านเยื่อกั้น (septum) ซึ่งมักเป็นยางซิลิโคนด้านบนคอลัมน์ ตัวฉีดชนิดนี้อาจมีการรั่วบริเวณรูที่ฉีด เพราะคอลัมน์มีความดันสูง

2.2 ชนิดโรตารี่ (rotary type) เป็นชนิดที่ใช้ลิ้นควบคุมการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยในขั้นตอนแรกจะใช้ไซริงก์ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่าง (sample loop) ซึ่งมีปริมาตรคงที่ (fixed loop injector) หลังจากนั้นจึงหมุนลิ้นให้สารละลายซึ่งเป็นเฟสนิ่งไล่ของเหลวทั้งหมดลงสู่คอลัมน์ นอกจากนี้ยังสามารถดูดสารตัวอย่างเข้าไปในปริมาตรที่ต้องการฉีดเข้าไปในท่อพักสารตัวอย่างซึ่งมีสารละลายอยู่ก่อนแล้วบางส่วน เมื่อหมุนลิ้นไปที่ตำแหน่งฉีด สารละลายจะพาสารตัวอย่างทั้งหมดเข้าไปในคอลัมน์ (syringe loop injector)

3. คอลัมน์ (column) อาจทำจากแก้ว พลาสติก หรือเหล็กกล้าไร้สนิม มีความยาวในการใช้งานตั้งแต่ 10-150 ซม. กรณีที่มีความยาวมากเกินอาจขดคอลัมน์เป็นวง แต่มักพบว่าประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร จนถึงหลายมิลลิเมตร สามารถทนแรงดันได้สูงถึง 6,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์

4. ตัวตรวจวัด (detector) มีหน้าที่วัดปริมาณของสารเพื่อส่งให้เครื่องบันทึกผล ทำการบันทึกค่าและแสดงกราฟของสารชนิดต่าง ๆ ตัวตรวจหามีหลายชนิดขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่ต้องตรวจหาตัวอย่างเช่น ตัวไวแสง (photo detector) ใช้สำหรับการวัดสารที่มีสีหรือมีความขุ่น ตัววัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) ใช้สำหรับวัดปริมาณสารที่สามารถเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ ตัววัดดัชนีหักเห (refractive index detector) ใช้สำหรับวัดสารละลายที่ใสและมีตัวถูกละลายอยู่ ตัววัดกัมมันตภาพรังสี (radioactivity detector) ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี ตัวตรวจหาแต่ละชนิดมีความไวและข้อจำกัดในการใช้งานแตกต่างกันดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ

ชนิด	ความไว (กรัม/มิลลิลิตร)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	$5x10^{-5}$	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้ในช่วง 254-280 นาโนเมตร
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	$5x10^{-7}$	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Conductivity	10^{-8}	±10 องศาเซลเซียส	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออน และถูกจับโดยแอโนด เพลท
Mass spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 นาโนกรัม

5. เครื่องบันทึกผล ใช้สำหรับแสดงตำแหน่งของสารที่ออกมาจากคอลัมน์เพื่อประโยชน์ในการจำแนกชนิดของสารหรือคำนวณหาปริมาณสาร ซึ่งสามารถคำนวณได้จากความสูงของยอดพีค (peak high) หรือพื้นที่ใต้พีค (peak area) โดยกราฟที่มีลักษณะสมมาตรควรคำนวณหาค่าจากความสูง แต่ถ้ากราฟเบ้ควรคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟ กราฟที่บันทึกได้สามารถนำไปสู่การคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่แสดงประสิทธิภาพของเครื่องมือ คือ

5.1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) หมายถึงความสามารถในการแยกแถบสารที่แคบ ซึ่งดูได้จากค่าความกว้างของแถบของสารตัวอย่างที่ห่างออกไปจากจุดกึ่งกลางของแถบสารตัวอย่าง (number of theoretical plates, N) โดยคำนวณจากสูตร

$$N = 5.54\,(T_r / W_{½})^2$$

โดย T_r = retention time =เวลาตั้งแต่ฉีดสารตัวอย่างจนถึงเวลายอดกราฟสูงสุดปรากฏ

$W_{½}$ = ความกว้างของกราฟที่ครึ่งหนึ่งของความสูงในหน่วย (มิลลิเมตร)

5.2 Capacity factor (K´) เป็นตัวชี้ตำแหน่งของสาร โดยการเปรียบเทียบเวลาหน่วงของสารตัวอย่างที่ถูกหน่วงในคอลัมน์เปรียบเทียบกับสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ คำนวณจากสูตร

$$K' = (T_r - T_0)/\,T_0$$

โดย T_r = retention time ของสารที่ถูกหน่วง

T_0 = retention time ของสารที่ไม่ถูกหน่วง

6. ระบบไมโครโพรเซสเซอร์ มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเครื่องมือ เพื่อให้เครื่องมือใช้งานสะดวก ลดอันตราย และทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สูงขึ้น

7. ชุดควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์สารส่วนใหญ่สามารถกระทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่เครื่อง HPLC บางแบบจะมีชุดควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้คงที่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกหรือวิเคราะห์สารต่าง ๆ

องค์ประกอบอื่นๆ

1. สารละลาย (solvent) สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีความจำเพาะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก แต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกันคือ มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปน และไม่ทำปฏิกิริยากับ เฟสนิ่ง คอลัมน์ ตัวฉีด ตัวตรวจหา และสารที่ต้องการแยกจนทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารที่ต้องการแยกเสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของสารละลายด้วย การใช้สารละลายไล่สารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์อาจพบได้ใน 2 ลักษณะคือ

1.1 Isocratic elution เป็นการใช้สารละลายเพียง 1 ชนิดไล่สารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์

1.2 Gradient elution เป็นการใช้สารละลายมากกว่า 1 ชนิด หรือใช้สารละลายชนิดเดียวแต่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันไล่สารต่าง ๆ ออกจาคอลัมน์ ซึ่งพบว่ามักมีประสิทธิภาพในการแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันได้ดีกว่า

2. สารละลายมาตรฐาน ใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณสารในสารตัวอย่าง สารละลายมาตรฐานอาจใช้งานใน 2 ลักษณะคือ

2.1 สารมาตรฐานภายนอก (external standard) นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างได้จากการอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน หรือใช้วิธีคำนวณเปรียบเทียบหาปริมาณของสารจากความสูงของกราฟ หรือพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งอาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริง ถ้าสภาพของคอลัมน์ หรือเครื่องมือในขณะทำกราฟมาตรฐานและการวิเคราห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2.2 สารมาตรฐานภายใน (internal standard) เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ใช้เติมลงในสารมาตรฐานภายนอกและสารตัวอย่างในปริมาณที่คงที่ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์ จะปรากฏเป็นกราฟอ้างอิงในตำแหน่งที่คงที่ในเครื่องบันทึกผล ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบหาความผิดปกติของเครื่องมือ โดยการดูการเปลี่ยนแปลงตำแหน่ง หรือเวลาหน่วง (retention time) ของสารมาตรฐานภายใน นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน Y เป็นสัดส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายนอกและความสูงของกราฟของสารมาตรฐานภายในส่วนแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วจึงนำค่าอัตราส่วนระหว่างความสูงของกราฟของสารตัวอย่างและความสูงของสารมาตรฐานภายใน ทำการอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟดังกล่าว วิธีนี้มีข้อดีตรงที่สามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง ถึงแม้ว่าเครื่องมือจะมีความผิดปกติในการวิเคราะห์บ้าง เพราะเป็นการหาค่าที่เทียบสัดส่วนกับสารมาตรฐานภายใน

3. เฟสนิ่ง (stationary phase) สารที่นำมาทำเป็นเฟสนิ่งมักมีขนาดที่คงที่สม่ำเสมออยู่ในช่วง 5-10 ไมโครเมตร แต่เนื่องจากเฟสนิ่งแต่ละชนิดมีพื้นที่ผิว ขนาดรู และสภาพมีขั้วต่างกันจึงจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละประเภท เฟสนิ่งที่นิยมใช้ได้แก่ silica gel, alumina และ celite (diatomaceous earth) แต่อาจพบเฟสนิ่งอีกชนิดหนึ่งคือ pellicular particle ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดแก้วขนาดประมาณ 40 ไมโครเมตร เคลือบด้วยอะลูมินา หรือ ซิลิกาให้มีความหนาประมาณ 1-3 ไมโครเมตร หรือเคลือบด้วยเรซินแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange resin) เฟสนิ่งชนิดนี้สามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสนิ่งและเฟสเคลื่อนที่ได้เร็วแต่มีความจุของเฟสนิ่งต่ำ

2.9.1 วิธีการหาสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนโดยใช้เครื่อง HPLC

Xie และคณะ (2009) ได้หาสารประกอบคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยวิธี HPLC ซึ่งเตรียมสารตัวอย่างโดยการนำมาสกัดกับเอทานอล โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวทำละลาย (อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำบริสุทธิ์สูง 5 ต่อ 5) ชั่งผงตัวอย่างจำนวน 0.5 กรัม เติมเอทานอลร้อยละ 50 จำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sonicator) 20 กิโลเฮิร์ต 250 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนกับส่วนใสที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ใส่ในขวดแก้วเล็กหุ้มขวดด้วยกระดาษฟลอยด์เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

2.10 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ

การออกแบบการทดลองในอดีตที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เป็นการออกแบบการทดลองทีละปัจจัย (one factor at a time) เป็นการทดลองที่ศึกษาปัจจัยที่สนใจเพียงอย่างเดียว โดยกำหนดให้ปัจจัยอื่นคงที่ และเมื่อได้ค่าผลการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจึงเปลี่ยนไปศึกษาปัจจัยตัวที่สอง และทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆจนครบทุกปัจจัยที่ต้องการจะศึกษา ข้อดีสำหรับการทดลองแบบนี้คือไม่ยุ่งยาก แต่ข้อเสียคือไม่สามารถทราบผลปัจจัยที่มีรวมกันได้ (Kumar และคณะ, 2006) และใช้เวลานานหากทำการศึกษาหลายปัจจัย (Saxena และคณะ, 2010) การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้จะทำให้ผลการทดลองที่ได้ ได้ไม่ดีที่สุด

ปัจจุบันมีการนำเอาโปรแกรมทางสถิติมาประยุกต์ใช้ในการออกแบบการทดลองงานวิจัย ซึ่งในการทดลองจะมีความครอบคลุม ทั้งระยะเวลาและทรัพยากรในการทดลอง (Chauhan และคณะ,2007) สามารถหาความสอดคล้องกับพื้นที่ตอบสนองและประเมินความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถทราบผลของปัจจัยที่ใช้รวมกันระหว่างปัจจัยได้ด้วยอิทธิพลร่วม คือผลของการที่ปัจจัยร่วมที่มีอยู่ในหลายกระบวนการ (Wu และคณะ, 2007 ; Chauhan และคณะ, 2007)

2.10.1 การออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design: CRD)

แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design ใช้คำย่อว่า CRD) เป็นแผนการทดลองที่มีลักษณะง่ายสะดวกในการปฏิบัติและวิเคราะห์ข้อมูลเหมาะสำหรับหน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอมากไม่มีความแตกต่างเนื่องจากปัจจัยอื่นๆหน่วยทดลองมีโอกาสได้รับทรีตเมนต์ใดทรีตเมนต์หนึ่งเท่ากันโดยวิธีการสุ่มให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับทรีตเมนต์ใดทรีตเมนต์หนึ่งด้วยความน่าจะเป็นที่เท่ากัน แผนการทดลองแบบ CRD นิยมทำการทดลองในห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลองเพราะสามารถควบคุมความคลาดเคลื่อนระหว่างการดำเนินการทดลองได้ การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับปัจจัยเดียว (one-way ANOVA) ใช้สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) แสดงดังตารางที่ 2.4 (สุคนธ์, 2549)

ลักษณะของรูปแบบการทดลอง

1. มีตัวแปรอิสระหรือตัวแปรทดลองเพียง 1 ตัวที่แบ่งออกเป็นหลายระดับ
2. หน่วยทดลองแต่ละหน่วยที่นำมาเป็นกลุ่มตัวอย่างจะต้องมาจากการสุ่ม
3. กลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับตัวแปรทดลองเพียงตัวเดียวโดยการสุ่ม

แผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ แสดงตัวแบบเชิงคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$Yij = \mu + Ti + \varepsilon ij$$

เมื่อ Y_{ij} = ค่าสังเกตแต่ละค่าที่ได้จากทรีตเมนต์ i ซ้ำ j

i = 1, ..., t (t = จำนวนทรีตเมนต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

j = 1, ..., t (r = จำนวนซ้ำ)

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง

Ti = อิทธิพลของทรีตเมนต์ i

εij = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

ตารางที่ 2.4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปวน (ANOVA)

Source of Variation	df	SS	MS	F
Between samples (Treatments)	t-1	SST	MST	MST/MSE
Within samples (Error)	t(r-1)	SSE	MSE	-
Total variation	Tr-1	-	-	-

ที่มา: สุคนธ์, 2549

ข้อเด่นของ ANOVA

1. สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของประชากรได้พร้อมกันมากกว่า 2 ประชากร ซึ่ง ถ้าเราใช้ T-Test จะทำได้มากที่สุดแค่ 2 ประชากรเท่านั้น
2. สามารถวิเคราะห์ได้มากกว่า 1 ปัจจัย (Factor) ซึ่ง T-Test จะทำได้เพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น เช่น อุณหภูมิ (Temperature) ความเร็ว (Speed) ความกด (Pressure)
3. สามารถใช้วิเคราะห์เพื่อให้เห็นผลกระทบซึ่งกันและกันของปัจจัยต่างๆ (Interaction) ได้ด้วย

ข้อกำหนดของ ANOVA

1. ข้อมูลของทุกๆ ประชากร จะต้องมีการกระจายของข้อมูลแบบปกติ (Normal distribution) เท่านั้น
2. ค่าความผันแปร (Variation) ของข้อมูล แต่ละประชากรจะต้องไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เท่านั้น

2.10.2 การออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

วิธีการออกแบบพื้นผิวตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวหรือ RSM เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหาเพื่อหาจุดที่ทำให้ผลผลิตของกระบวนการมีค่ามากที่สุด ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับการทดลองที่มีหลายๆปัจจัย และสามารถหาจุดที่เหมาะสม (optimization) จากความสัมพันธ์ของปัจจัยเหล่านั้นได้เช่นการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้น (input variable) หรือปัจจัยเชิงปริมาณกับค่าการตอบสนอง (response variable) เป็นคุณภาพของผลผลิตที่ต้องการ (วีรเทพ ,2550) นอกจากนี้ยังสามารถแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนองเมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลงและการหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (optimum value) ที่จะทำให้ได้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมจากผลตอบสนองหลายๆค่าได้ (นงเยาว์, 2554) หลักการที่สำคัญของการทำพื้นผิวตอบสนองเพื่อนำเสนอผลการวิจัยคือการที่จะนำเสนอแบบพื้นผิวตอบสนองต้องมีแผนการทดลองที่เหมาะสมอย่างน้อยต้องมีปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ 2 ตัวขึ้นไปและต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณต้องมีตัวแปรตามอย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไปและต้องเป็นตัวแปรเชิงปริมาณด้วยดังนั้นแผนการทดลองที่จะสามารถสร้างพื้นผิวตอบสนองได้คือ Factorial Design, Mixture Design, Central Composite Design (CCD) และ Plackett & Burman Design นอกจากนี้ระดับของตัวแปรอิสระที่ต้องผันแปรไปนั้นจะเป็นต้องครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำข้อมูลของตัวแปรอิสระแต่ละตัว (xi) ที่สัมพันธ์กับข้อมูลของตัวแปรตาม (yi) สร้างเป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (model) (กัลยาณี, 2554) และนำแบบจำลองนี้ไปใช้ในการคาดคะเน (prediction) หรือปรับกระบวนการให้เหมาะสม (process optimization) ซึ่งโดยทั่วไปตัวแปรตามแต่ละตัวแปรหรือค่าตอบสนอง (response) จะขึ้นกับตัวแปรอิสระความสัมพันธ์ ระหว่างตัวแปรเหล่านี้สามารถอธิบายโดยแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่าสมการรีเกรสชั่น (สมการถดถอย; regression equation) เมื่อพิจารณาสมการที่ 2.1 (ไพโรจน์, 2555)

$$Y = (x_1 + x_2 ... x_n) + \varepsilon \qquad (2.1)$$

โดยกำหนดให้

Y = ตอบสนองที่สังเกตได้ (dependent variable)

F = ฟังก์ชั่นของการตอบสนองของ $x_1 + x_2 ... x_n$ ซึ่งเป็นตัวแปรเชิงปริมาณ (independent variable)

ε = เทอมของความคลาดเคลื่อน

โดยกำหนดให้ปัจจัยนั้นแทนค่าด้วย X และ ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นในค่าสังเกตุ Y ที่เป็นผลมาจากการทดลอง ถ้ากำหนดว่า $E(Y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ดังนั้นสามารถเขียนสมการของพื้นผิวตอบสนองได้ตามสมการที่ 2.2

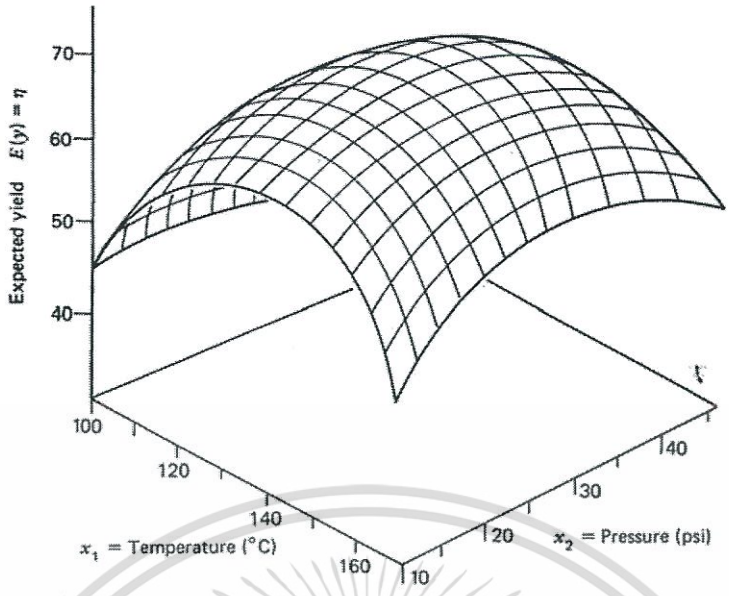
$$\eta = (x_1, x_2) \qquad (2.2)$$

ซึ่งจะเรียกว่าพื้นผิวตอบสนอง (response surface) (Montgomery, 1991) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวในรูปของกราฟิกโดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ x_1 และ x_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวผลตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น (โครงสร้าง 3 มิติ แสดงดังภาพที่ 2.8 ภาพที่ 2.9 และภาพที่ 2.10)

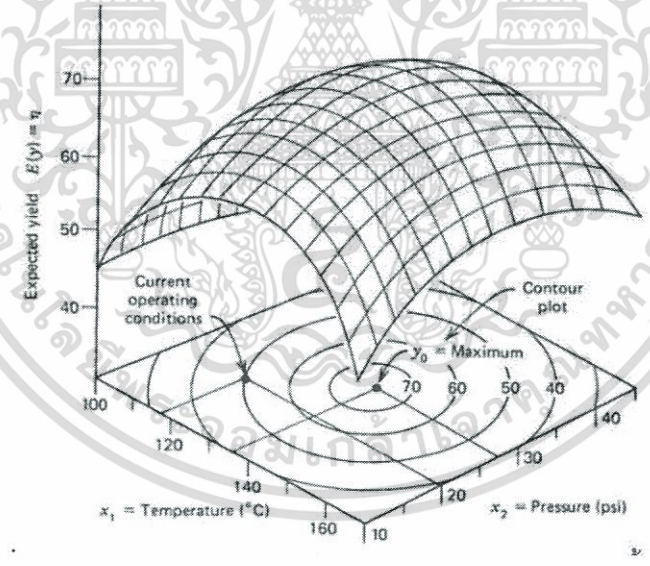
อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นผิวตอบสนองนั้นจำเป็นต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตามค่าตอบสนองต่อตัวแปรอิสระต่างๆเป็นลำดับแรกการค้นหาฟังก์ชันต่างๆเหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (polynomial) ลำดับต้นๆเช่นลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) ลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์แบบหนึ่ง แสดงดังสมการที่ 2.3

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_k x_k + \varepsilon \qquad (2.3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

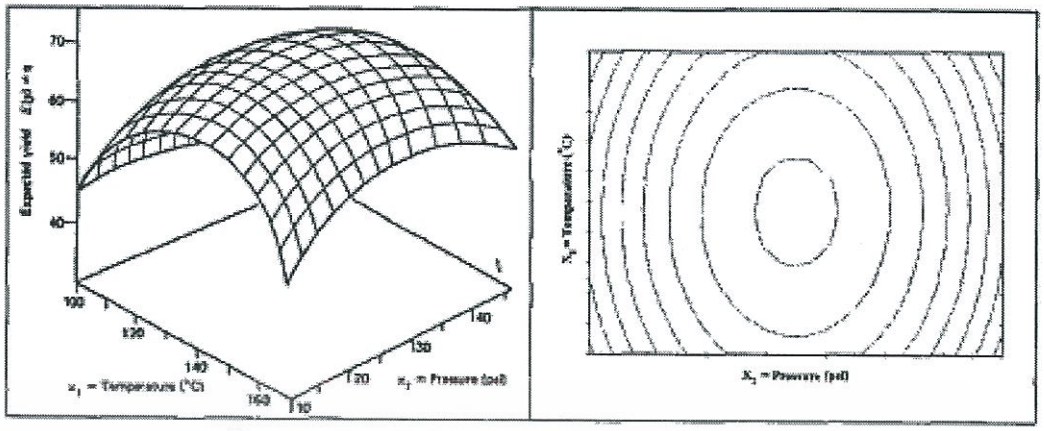


ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง 3 มิติของพื้นผิวตอบสนอง
ที่มา: Montgomery, 1991



ภาพที่ 2.9 Contour plot ของพื้นผิวตอบสนองโครงสร้าง 3 มิติ
ที่มา อิศรพงษ์, 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

ภาพที่ 2.10 แสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปแบบของกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว (ก) กราฟ 3 มิติ (Responsesurface) (ข) กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (Contour plot)
ที่มา : Montgomery, 1991

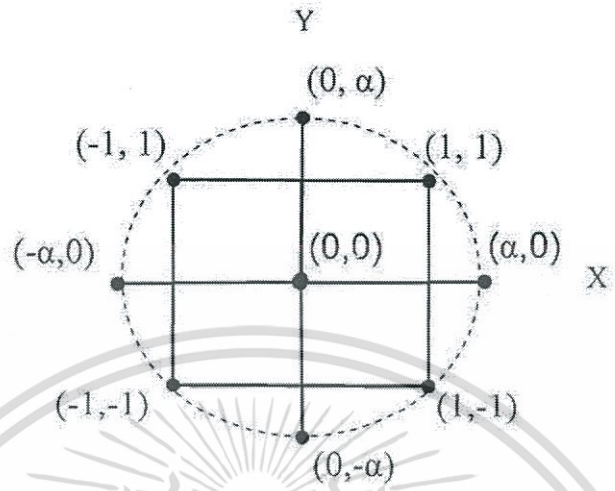
2.10.3 การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD)

ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่ง หรือแบบจำลองกำลังสองในการหาพื้นผิวตอบสนอง แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจอยู่มีขนาดใหญ่ การออกแบบพื้นผิวตอบสนองมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่วิธีการกำลังสองน้อยสุด (least square) การปีนด้วยทางชันการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่หนึ่ง (first-order model) และการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สอง (second -order model) ซึ่งการออกแบบสาหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การสร้างแบบจำลอง quadratic ของผลตอบสนองมีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ การออกแบบส่วนประสมกลางและการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design)

การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหาแผนการทดลองที่เหมาะสมเพื่อหาสภาวะในการผลิตโดยวิธี RSM ที่มีตัวแปรอิสระหลายตัวแปรและให้หน่วยการทดลองที่ไม่มากเกินไป แต่ครอบคลุมจุดที่สำคัญ คือ การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ $2k$ factorialin CRD หรือRCBD อย่างสมบูรณ์หรือเพียงบางส่วน $2k$ axial point หรือจุดที่อยู่บนแกน coordinate และจุดศูนย์กลาง เมื่อ k คือปัจจัยในการทดลอง และ m คือจำนวนการทดลองที่จุดศูนย์กลาง ดังนั้นหน่วยการทดลองทั้งหมด (n) ได้จาก n = $2k$ + $2k$ + m แสดงในภาพที่ 2.12 (สมมุติถ้า k ในที่นี้คือตัวแปรอิสระหรือปัจจัย 2 ตัว) ดังนั้น 2×2 จะมีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง (-1,-1) (+1,-1) (+1, +1) (-1, +1) ตำแหน่งการทดลองที่เพิ่มขึ้นมาอีก 4 ตำแหน่งคือตำแหน่งที่เป็นแนว $+\alpha$ หรือ $-\alpha$ ในแนวแกนที่เรียกว่า star point ($+\alpha$, 0) ($-\alpha$, 0) (0, $+\alpha$) (0, $-\alpha$) เพราะฉะนั้นการทดลองแบบ CCD ในกรณีที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัวจะมีตำแหน่งเพิ่มขึ้นจาก 22 fractorial design อีก 5 ตำแหน่ง (2k+1) คือ ($+\alpha$, 0) ($-\alpha$, 0) (0, $+\alpha$) (0, $-\alpha$) และ (0, 0) เพื่อให้จุดหนึ่งของการเพิ่มเป็นจุดกึ่งกลางและจุดที่เหลือ 2k เป็นจุดห่างαรวมทั้งหมดเป็น 9 สิ่งการทดลองแสดงในภาพที่ 2.11 สำหรับจำนวนตัวแปรอิสระ 3 ตัว (k = 3) จะทำให้การออกแบบ 2^k

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

factorial designs + (2k+1) มี 15 สิ่งทดลองดังแสดงแสดงในรูปที่ 2.11 ทำให้การทดลองแบบนี้จึงสามารถครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการ (กัลยาณี, 2544)



ภาพที่ 2.11 ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนของ CCD และจุดของการออกแบบ 9 สิ่งทดลอง สำหรับ 2 ปัจจัย**ที่มา:** เสาวนีย์, 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ และเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 วัตถุดิบ

ข้าวสังข์หยด และข้าวไรซ์เบอร์รี่

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เห็ดถั่งเช่าธิเบต (*Cordyceps sinensis*)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.2.1 Potato Dextose Agar (PDA) เสริม

3.2.2 Potato Dextose Broth (PDB) เสริม

3.3 สารเคมีและอุปกรณ์

คอลัมน์ชนิด Shimadzu C_{18} (3.5 ไมโครเมตร × 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร) และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) EMSURE®	บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมันนี
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	บริษัทห้างขายยาตราเสือดาว จำกัด ประเทศไทย
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	บริษัท Bacto™ Dickinson Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
เปปโตน (Peptone)	บริษัท Bacto™ Dickinson Company ประเทศสหรัฐอเมริกา
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	บริษัท Fluka Biochemical ประเทศเยอรมันนี
ผงวุ้น (Agar Power)	-
แอลกอฮอล์ร้อยละ 95	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย
เมทานอล (Methanol)	บริษัท SK Chemical ประเทศเกาหลี
กลีเซอรอล (Glycerol)	บริษัท Ajak Finechem Pty Lyd ประเทศออสเตรเลีย
น้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure)	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการเตรียมหัวเชื้อ

3.4.1 หัวเชื้อจุลินทรีย์

การผลิตหัวเชื้อในขั้นตอนแรกจะทำการแยกเชื้อราของเห็ดถั่งเช่าธิเบต (*C. sinensis*) จากดอกเห็ดธรรมชาติ และทำการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าธิเบตไว้ในอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย potato dextrose agar (PDA เสริม) ในหลอดทดลองซึ่งมีผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 วัน ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น โดยการตัดหัวเชื้อเห็ดที่ขึ้นบนอาหารวุ้นด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 5 ตารางมิลลิเมตร นำไปใส่ลงในขวดแบน ที่มีอาหาร PDA เสริม บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นจึงนำเชื้อมาใช้ได้ (ดัดแปลงจาก Das และคณะ (2010)) เก็บรักษาเห็ดถั่งเช่า (*Cordycep sinensis*) ไว้ในอาหารเลี้ยงเส้นใย potato dextrose agar (PDA) และเก็บในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีการเติมตัวหนอนปริมาณเล็กน้อย และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อในอาหารเหลว

การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว ในขั้นตอนแรกจะเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในจานเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 5-6 วันจากนั้นจึงย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB โดยตัดเป็นชิ้นออกไป ขนาด 1×1 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น (ต่อฟลาสก์) ของการเลี้ยงในจานเพาะเชื้อด้วยการตัดในสภาพที่ปลอดเชื้อ การเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จะเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร potato dextrose broth (PDB เสริม) 100 มิลลิลิตร ที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าที่ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุกๆวัน วันละ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบ/นาที เทส่วนที่ใสด้านบนออก จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 หนึ่งครั้ง แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณหาน้ำหนักแห้ง เพื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อ

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง

3.5.1 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยในการผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันในการเพาะเลี้ยงเส้นใย (ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่) ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ทำการทดลองโดยใช้อาหาร PDB เสริม (ตารางที่ 2) โดยใช้แหล่งคาร์บอน ร้อยละ 2 เปรียบเทียบและทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน ซึ่งชุดควบคุมคือ ใช้ PDB เสริมโดยไม่ใช้ธัญพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยในการผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยในสภาวะอาหารแข็ง โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันในการเพาะเลี้ยงเส้นใย (ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่) ในการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งในอาหารสูตร PDA เสริม (ตารางที่ 3) ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยในที่มืดจนเส้นใยเจริญคลุมข้าว จากนั้นเพาะเลี้ยงในที่สว่างและทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 5 ครั้ง จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน ซึ่งชุดควบคุมคือ ใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอนและเพาะเลี้ยงในที่มืด

3.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดถั่งเช่าธิเบต

3.6.1 การวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน

สกัดโดยวิธีของ Xie และคณะ (2009) นำส่วนใสที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถะสูงโดยใช้คอลัมน์ C_{18} (ขนาด 3.5 ไมโครเมตร × 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร) โดยใช้เมทานอล : น้ำ (15 : 85) ให้มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการฉีดตัวอย่างทุกครั้งต้องทำการกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนฟิวเตอร์ขนาด 0.45 ไมครอน ทำการวิเคราะห์โครมาโตรแกรมที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Xie และคณะ, 2009)

3.7 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเส้นใยของเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่า บนอาหาร PAD เสริม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นสังเกตลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง โดยสังเกตลักษณะของรูปร่างเส้นใยด้วยการย้อมสีแลคโตฟีนอล คอตทอลบลู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 40 เท่า

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 23 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's New Multiple Range method เพื่อหาน้ำหนักแห้งที่ระยะต้น กลาง และปลายของระยะเอ็กโพเนนเชียลในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PDB โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และศึกษาปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่มีแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน โดยใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) และ Duncan's New Multiple Range method วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธีทางสถิติ ANOVA นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหัวเชื้อในอาหารเหลว

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของน้ำหนักเส้นใยแห้งในการเลี้ยงหัวเชื้อของสภาวะเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ คือ ชั่วโมงที่ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ผลจากการทดลอง พบว่าเส้นใยจะมีการเจริญสูงสุดที่ 120 ชั่วโมง คือมีปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้งเท่ากับ 9.93 กรัม/ลิตร และเส้นใยมีการเจริญลดลงที่ 144 ชั่วโมง คือมีปริมาณน้ำหนักเส้นใยแห้งเท่ากับ 8.57 กรัม/ลิตร แสดงดังตารางที่ 4.1

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ พบว่าชั่วโมงที่ 96, 120 และ 144 ปริมาณเส้นใยแห้งที่ได้เท่ากับ 9.40, 9.93 และ 8.57 กรัม/ลิตร ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณเส้นใยแห้งที่ได้ในระยะเวลาดังกล่าว มีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Wu และคณะ (2009) ทำการทดลองเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* เลี้ยงในฟลาสก์ที่เขย่า (shake flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ลิตร/นาที ความเร็วในการกวนคือ 130 รอบ/นาที ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะได้น้ำหนักแห้งของเส้นใยเท่ากับ 12.3 กรัม/ลิตร

ดังนั้นการศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย จึงเลือกที่เวลา 96 ชั่วโมง มาทำการทดลองในขั้นถัดไป เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและพลังงานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ

4.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในสภาวะอาหารเหลวและอาหารแข็ง

4.2.1 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่า และการผลิตสารสำคัญ คือสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อ *Cordyceps sinensis* ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ซึ่งในการทดลองจะใช้ธัญพืชที่ต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ธัญพืชที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวสังข์หยด และมีตัวควบคุมคือ อาหาร PDB เสริม (ตามตารางที่ 2) ซึ่งในตัวควบคุมจะไม่มีการใส่ธัญพืช ทำการทดลองโดยการกำหนดปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ชนิดของธัญพืชและเวลา จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญคือ สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง โดยนำค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟมาแทนค่า x ในสมการเส้นตรงของสารคอร์ไดเซปินมาตรฐาน และสารอะดีโนซีนมาตรฐาน ได้สมการเส้นตรงแสดงดังสมการที่ 4.1

$$Y = 2649.50X - 195.40 \qquad (4.1)$$

และสารอะดีโนซีนคำนวณจากค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟมาแทนค่า x ในสมการเส้นตรงของสารอะดีโนซีนมาตรฐาน ได้สมการเส้นตรงแสดงดังสมการที่ 4.2

$$Y = 3608.80X + 4991.70 \qquad (4.2)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองการศึกษาชนิดของธัญพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารสำคัญคือ สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่า พบว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด และตัวควบคุม มีปริมาณอะดีโนซีนเท่ากับ 23.18, 21.57 และ 9.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวสังข์หยดมีปริมาณสารอะดีโนซีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 23.18 และ 21.57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างของการทดลอง

ตารางที่ 4.1 ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของหัวเชื้อในสภาวะเขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง) / ตัวอย่าง	24	48	72	96	120	144
น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)	0.10^{c}	1.57^{c}	5.20^{b}	9.40^{a}	9.93^{a}	8.57^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารอะดีโนซีนในแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในอาหารเหลว

แหล่งคาร์บอน	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	ข้าวสังข์หยด	Control
ปริมาณสารอะดีโนซีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	23.17^{a}	21.57^{a}	9.67^{b}

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

4.2.2 การทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใย โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดถั่งเช่า และการผลิตสารสำคัญคือสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีน โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเชื้อ *Cordyceps sinensis* ในแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ซึ่งในการทดลองจะใช้ธัญพืชที่ต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ธัญพืชที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด และมีตัวควบคุมคือ ใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอนและบ่มในที่มืด ทำการทดลองโดยการกำหนดปัจจัย 2 ปัจจัย คือ ชนิดของธัญพืช และเวลา จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญคือ สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนด้วยเครื่อง โครมาโทกราฟของเหลวแบบสมรรถภาพสูง โดยนำค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟมาแทนค่า x ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมการเส้นตรงของสารคอร์ไดเซปินมาตรฐาน ดังแสดงในสมการที่ 4.1 และสารอะดีโนซีนคำนวณจากค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟมาแทนค่า x ในสมการเส้นตรงของสารอะดีโนซีนมาตรฐาน แสดงดังสมการที่ 4.2

จากผลการทดลองการศึกษาชนิดของธัญพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารสำคัญ คือ สารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่า พบว่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด และตัวควบคุม มีปริมาณอะดีโนซีนเท่ากับ 6.30, 4.27 และ 6.43 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 และจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติข้าวไรซ์เบอร์รี่ และตัวควบคุม มีปริมาณสารอะดีโนซีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ 6.31 และ 6.43 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่พบสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างของการทดลองนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาเห็ดถั่งเช่าจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันเพื่อใช้ยืนยันผลพบว่าชุดการทดลองการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าที่มาจากเมืองเจียงซี Huadong และ Wanfong ไม่พบสารคอร์ไดเซปิน ส่วนเมือง Boding พบสารคอร์ไดเซปินในปริมาณที่ต่ำกว่าเกณฑ์

ดังนั้นการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่า จึงเลือกข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพราะข้าวไรซ์เบอร์รี่ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสูง และหาได้ง่าย

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารอะดีโนซีนจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในอาหารแข็ง

แหล่งคาร์บอน	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	Control	ข้าวสังข์หยด
ปริมาณสารอะดีโนซีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	6.31[a]	6.43[a]	4.27[b]

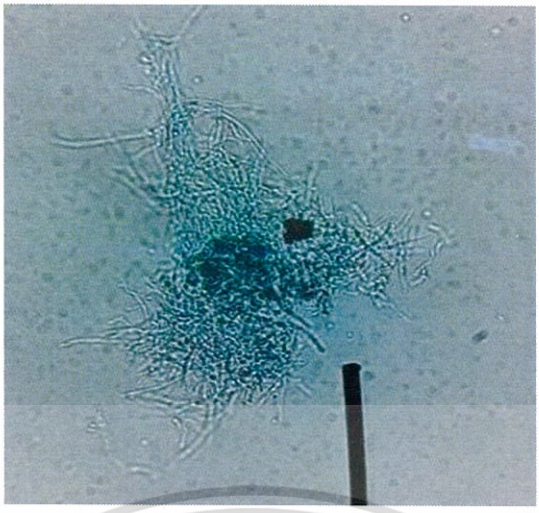
หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดถั่งเช่า

4.3.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยา

เมื่อนำเชื้อเห็ดถั่งเช่าที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เสริม บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาสังเกตลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าเส้นใยจัดเรียงตัวกันเป็นกลุ่ม มีรูปร่างเป็นเส้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเส้นใยเห็ดถั่งเช่า ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดาที่กำลังขยาย 40 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใย พบว่าหัวเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่เวลา 96 ชั่วโมง ในที่มืดที่มีความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลอง

นอกจากนี้สารอินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเส้นใยในครั้งนี้ จากการเปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นธัญพืช ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวสังข์หยด เพาะเลี้ยงเส้นใยในสภาวะอาหารเหลว และในสภาวะอาหารแข็ง โดยการใช้วิธีการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในสภาวะอาหารเหลวให้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุด คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (23.17 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และในสภาวะอาหารแข็งให้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุด คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (6.31 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แต่ไม่พบสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างทั้งในสภาวะอาหารเหลวและสภาวะอาหารแข็ง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการทดลองเพื่อใช้ยืนยันผล 2 ชุดการทดลอง เพื่อให้การทดลองที่ทำออกมานี้มีความน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับมากขึ้น และควรศึกษาหาสารอินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติชนิดอื่นเพิ่มเติม เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตทางการเกษตรซึ่งเป็นแหล่งสารอินทรีย์ที่มีความหลากหลาย อาจทำให้ได้แหล่งสารอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *C. sinensis* และส่งผลทำให้ได้ปริมาณสารอะดีโนซีนในปริมาณมากเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี เต็งพงศธร. 2554. เอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการทดลองทางอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัท ทูโฟร์ พรินติ้ง จำกัด.

นงเยาว์ ชูสุข. 2554. เทคนิคในการพัฒนาผลิตภัณฑ์. ปราจีนบุรี: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือคณะอุตสาหกรรมเกษตร.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และธิดารัตน์ จันทร์ดอน. 2556. “ถั่งเช่า” ช่วยเพิ่มสมรรถภาพ จริงหรือ? [Online]. Avaliable : http://www.phamacy.mahidol.in.th/th/knowledge/153 ถั่งเช่าช่วยเพิ่มสมรรถภาพ-ได้จริงหรือ. (สืบค้นวันที่ 17 เมษายน 2559)

พิมพ์ชนก. 2556. ประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่. [Online]. Avaliable: http://www.thaihealth.or.th (สืบค้นวันที่ 5 เมษายน 2559)

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และเกียรติคุณ นิธิยา รัตนาปนนท์. อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์. [Online].Avaliable:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1543/generateon-time. (สืบค้นวันที่ 15 เมษายน 2559)

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2555. การออกแบบการทดลองขั้นสูง. พิมพ์ครั้งที่ 2 เชียงใหม่ : ทรีโอ แอเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ มีเดีย จำกัด.

วีรเทพ เฉลิมสมิทธิ์ชัย. 2550. “การศึกษาปริมาณธาตุที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมการผลิตเหล็กดิบโดยวิธีการออกแบบการทดลอง”. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

สุคนธ์ ประสิทธ์วัฒนเสรี. 2549. สถิติเบื้องต้น. การวางแผนการทดลอง (Experimental Design). ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2555. มหัศจรรย์ “เห็ดเป็นยา”. [Online]. Avaliable : http://www.anonbiotec.com/mushroom02_3.html. (สืบค้นวันที่ 7 พฤษภาคม 2559)

อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. [Online]. Avaliable: http://202.28.24.44/e_books/issrapong/stat.html. (สืบค้นวันที่ 7 พฤษภาคม 2559)

Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K.C. (2007). Statistical screening of medium components by Placktt-Burmam desings for lactic acid production by *Lactobacillus sp.* KCP01 using date juice. Bioresource Technolog. 98: 98-103.

Chen, Y., Chen, Y.C., Lin, Y.T., Huang, S.H. and Wang, S.M. (2010). Cordycepin induces apoptosis of CGTH W-2 thyroid carcinoma cells through the calcium-calpaincaspase 7-PARP pathway. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(22): 11645-11652.

Choi, J.W., Ra, K. S., Kim, S. Y., Yoon, T. J., Yu, K.W., Shin, K. S., Lee,S. P., & Suh, H. J. (2010). Ehancement of anti-complementary and radical scavenging activities in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. Bioresource Technology. 101 : 6028–6034.

Dong, C. H and Yao, Y. J. (2005). Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. Journal of Applied Microbiology. 99: 483–492.

Fang-Qiu Guoa, Ai Lia, Lan-Fang Huanga, Yi-Zeng Liang a, Ben-Mei Chenb. (2006). Identification and determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 40: 623–630.

Ferris CD. (1980). Guide to medical laboratory instruments. Little Brown and Company, Boston.

Hickers M.R. Schenmken J.R. Steinrauf M.A. Mc Whorler C.A. (1980) Laboratory instrumentation 2 nd ed. Harper Row Publishers. Philadelphia.

Ing-Lung Shih, Kun-Lin Tsai, Chienyan Hsieh. (2007). Effects of culture conditions on The mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochemical Engineering Journal. 33 : 193–201.

Jang Won Choi, Kyung Soo Ra, Seong Yeong Kim. (2010). Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. Bioresource Technology 101: 6028–6034.

Jiamin Li, Minyi Guan, Yi Li. (2015). Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*. Procedia Engineering. 102: 485–491.

Jone R.R. (1991). HPLC keeping grow away the separation sciences. R&D 31: 54-7.

Jong Seok Lee, Woo Chul Jung, Seok Jae Park, Keun Eok Lee, Won Cheol Shin, and Eock Kee Hong. (2013). Culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Paecilomyces japonica* in liquid culture. Journal of Bioscience and Bioengineering. 115(4) : 433-437.

Junqiao Wang, Lijiao Kan, Shaoping Nie, Haihong Chen, Steve W. Cui, Aled O. Phillips, Glyn O. Phillips, Yajing Li, Mingyong Xie. (2015). A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. LWT-Food Science and Technology. 63: 2-7.

Kim, H., Naura, A.S., Errami, Y., Ju, J. and Boulares, A.H. (2011). Cordycepin blocks lung injury-associated inflammation and promotes BRCA1-deficient breast cancer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cell killing by effectively inhibiting PARP. Molecular Medicine. 17 : 893–897.

Kim, H. O., & Yun, J. W. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. Journal of Applied Microbiology. 99 : 728–738.

Lang, J., Qi, X., Hou, Y., Zhao, S., & Jiang, G. (2009). Production of exopolysaccharides by *Cordyceps sinensis* in liquid culture. Journal of Dalian Polytechnic University. 28, 10 (in Chinese).

Lan -Ying Wang, Kit-Leong Cheong, Ding-Tao Wu, Lan-Zhen Meng, Jing Zhao, Shao-Ping Li. (2015). Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. Lanternational Journal of Biological Macromolecules. 79: 180–185.

Lee, S.H., Park, C.S. and Kim, J.S. (2009). Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-KB pathway in humandermal fibroblast. Experimental and Molecular Medicine. 41(8) : 548-554.

Lee, Y.R., Noh, E.M., Jeong, E.Y., Yun, S.K., Jeong, Y.J., Kim, J.H., Kwon, K.B., Kim, B.S., Leung, P. H., Zhang, Q. X., & Wu, J. Y. (2006). Mycelium cultivation, chemical composition and antitumor activity of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. Journal of Applied Microbiology. 101: 275–283.

Li, S. P., Zhao, K. J., Ji, Z. N., Song, Z. H., Dong, T. T. X., Lo, C. K.,Cheung, J. K. H., Zhu, S. Q., & Tsim, K. W. K. (2003). A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. Life Sciences. 73: 2503–2513.

Ling, J.Y., Zhang, G.Y., Lin, J.Q., Cui, Z.J. and Zhang, C.K. (2009). Supercritical fluid extraction of cordycepin and adenosine from *Cordyceps kyushuensis* and purification by high-speed counter-current chromatography. Separation and Purification Technology. 66: 625-629.

Montgomery, D.C. (1991). Design and Analysis of Experiments. 3th ed., U.S.A. : John Wiley & Sons.

Rao, Y.K., Chou, C.H. and Tzeng, Y.M. (2006). A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis. Analytic Chimica Acta. 566: 253-258.

Saxena, R and Singh, R. (2010). Statistical optimization of condition for protease production from *Bacillus* sp. Acta Biologica Szegediensis. 54(2) : 135-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Skoog D. Principle of instrumental analysis. (1986). Library of Congress Cataloging in Publication Data. USA.

Tuli, H.S., Sharma, A.K., Sandhu, S.S. and Kashyap, D. (2013). Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential. Life Sciences. 93 : 863–869.

Wu, C., Chen, Y., & Hao, Y. (2009). Production of mycelia and polysaccharides by liquid fermentation of *Cordyceps sinensis*. Food Science, 30, 171–174 (in Chinese).

Wu, Q.-L., Chen, T., Gan, Y., Chen, X. and Zhao, X-M. (2007). Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs. Applied Microbiologu Biotechnology. 74: 61-68.

Xia Chen Jianyong Wu, Xiaoting Gui.(2015). Production and characterization of exopolysacchrides in mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 with different carbon sources. The 6th Global Chinese Symposium of Chemical Engineering .Hong Kong UST.

Xiao Yu, Guangliang Xing, Xin Rui, Wei Li, Xiaohong Chen, Mei Jiang, Mingsheng Dong. (2015). Effect of solid-state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18 on physicochemical and functional properties of chickpea (*Cicerarietinum* L.) flour. 1317-1324.

Yin, H., Qiao, C., Qin, S., Tang, W., & Jia, S. (2013). Optimization of fermentation medium for *Cordyceps sinensis*. Food Research & Development. 34: 5–8 (in Chinese).

Zhao, Shao-Ping Li. (2015) Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. International Journal of Biological Macromolecules. 79: 180–185.

Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. and Tang, K. (2009). *Cordyceps* fungi : natural products, pharmacological functions and developmental products. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 61: 279–291.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย

1. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าธิเบตเริ่มต้น

ตารางที่ 1

สิ่งที่ใช้	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
เปปโตน	5
สารสกัดจากยีสต์	5
ผงวุ้น	18

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าธิเบต

1. ล้างมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนให้สะอาด ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นแบบเลย์ชิฟความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร 200 กรัม ส่วนข้าวโพดอ่อนหั่นตามขวางประมาณ 50 กรัม
2. ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เมื่อน้ำเดือดให้จับเวลา 20 นาที
3. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
4. ชั่งสาร (ผงวุ้น เปปโตน สารสกัดจากยีสต์) แล้วนำมาละลายในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
4. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาพักทิ้งไว้ 1 คืน หรือ 12 ชั่วโมง

2. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าธิเบตในอาหารเหลว PDB เสริม

ตารางที่ 2

สิ่งที่ใช้	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
ธัญพืช (ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่)	ร้อยละ 2
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
เปปโตน	5
ยีสต์สกัด	5
ผงดักแด้	50

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า

1. เตรียมมันฝรั่งล้างน้ำสะอาดปลอกเปลือกหั่นแบบเลย์ชิพความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร
2. เตรียมข้าวโพดอ่อนปลอกเปลือกสะอาดผ่าครึ่งตามยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ต้มมันฝรั่ง (200 กรัม) และข้าวโพดอ่อน (50 กรัม) ในน้ำสะอาด 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้จับเวลา 20 นาที

4. กรองเอาแต่น้ำ (ปรับปริมาตรของน้ำให้ได้ 1 ลิตร)

5. นำส่วนผสมอื่น (กลูโคส เปปโตน ยีสต์สกัด) มาใส่รวมกันในน้ำมันฝรั่ง+ข้าวโพดอ่อน คนจนส่วนผสมเข้ากันพอดี

6. เตรียมธัญพืช (ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด) ใส่ขวดแก้ว (16 OZ) ประมาณ 40 กรัม และนำน้ำส่วนผสมตามข้อ 5 ใส่ลงในโหลประมาณ 60 มิลลิลิตร ปิดฝาโหลเข้า (หมุนให้สนิท) ด้วยฝาพลาสติกที่เจาะรูตรงกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง = ดอกสว่าน 3 หุน) และอุดสำลีไว้

7. นำขวดโหลเข้านึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาพักทิ้งไว้ 1 คืน หรือ 12 ชั่วโมง

3. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าธิเบตในอาหารแข็ง PDA เสริม

ตารางที่ 3

สิ่งที่ใช้	**ปริมาณ (กรัม/ลิตร)**
ธัญพืช (ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่)	1000
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
เปปโตน	5
ยีสต์สกัด	5
ผงดักแด้	50

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า

1. เตรียมมันฝรั่งล้างน้ำสะอาดปลอกเปลือกหั่นแบบเลย์ชิพความหนาประมาณ 3

2. เตรียมข้าวโพดอ่อนปลอกเปลือกสะอาดผ่าครึ่งตามยาว

3. ต้มมันฝรั่ง (200 กรัม) และข้าวโพดอ่อน (50 กรัม) ในน้ำสะอาด 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้จับเวลา 20 นาที

4. กรองเอาแต่น้ำ (ปรับปริมาตรของน้ำให้ได้ 1 ลิตร)

5. นำส่วนผสมอื่น (กลูโคส เปปโตน ยีสต์สกัด) มาใส่รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน คนจนส่วนผสมเข้ากันพอดี

6. เตรียมธัญพืช (ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด) ใส่ขวดแก้ว (16 OZ) ประมาณ 40 กรัม และนำน้ำส่วนผสมตามข้อ 5 ใส่ลงในโหลประมาณ 60 มิลลิลิตร ปิดฝาโหลเข้า (หมุนให้สนิท) ด้วยฝาพลาสติกที่เจาะรูตรงกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง = ดอกสว่าน 3 หุน) และอุดสำลีไว้

7. นำขวดโหลเข้านึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาพักทิ้งไว้ 1 คืน หรือ 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ขั้นตอน	สภาพแวดล้อม	ข้อสังเกต	ระยะเวลา (ประมาณ)
1. บ่มเชื้อ (อาหารเพาะ)	แสง : มืด อุณหภูมิ : 20 – 22 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ : 150 รอบ/นาที	ลักษณะเส้นใยกระจายในอาหารเหลว	PDB เสริม : 3 วัน

วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

ขั้นตอน	สภาพแวดล้อม	ข้อสังเกต	ระยะเวลา (ประมาณ)
1. บ่มเชื้อ (อาหารเพาะ)	แสง : มืด อุณหภูมิ : 20 – 22 องศาเซลเซียส	ลักษณะเส้นใยเดินเต็มข้าว	PDA เสริม : 2 สัปดาห์
2. กระตุ้นเส้นใย	แสง : 180 ลักซ์ อุณหภูมิ : 20 – 22 องศาเซลเซียส	ลักษณะเส้นใยเดินเต็มข้าว	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน

1. ทำการบดเส้นใยแห้ง (ในอาหารเหลวต้องทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze Dry ก่อน) และสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพมากขึ้น นำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (40 เฮิร์ท) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

2. นำตัวอย่างที่ได้ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. นำส่วนใสที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง โดยใช้คอลัมน์ C_{18} (ขนาด 3.5 ไมโครเมตร × 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร) โดยใช้เมทานอล : น้ำ (15 : 85) ให้มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการฉีดตัวอย่างทุกครั้งต้องทำการกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรนฟิวเตอร์ขนาด 0.45 ไมครอน

4. ทำการวิเคราะห์โครมาโตรแกรมที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
วิธีการคำนวณ

วิธีการคำนวณน้ำหนักแห้ง

1. เก็บตัวอย่างโดยทำการสุ่มตัวอย่างนำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกค่า
2. นำตัวอย่างไปอบแห้งและบันทึกค่า
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการนี้

น้ำหนักแห้ง = น้ำหนักหลอดที่มีตะกอนเซลล์หลังอบ – น้ำหนักหลอดเปล่าหลังอบ

วิธีการคำนวณหาร้อยละความชื้น

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนนำไปอบแห้งด้วยความเย็น
2. ชั่งน้ำหนักทุกๆ 24 ชั่วโมงจนได้ปริมาณน้ำหนักแห้งคงที่
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

วิธีการคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

สารคอร์ไดเซปิน

การคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution) สารคอร์ไดเซปิน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องการสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

จะได้ว่า 1000 × 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × 1 มิลลิลิตร

= 1,000,000 ไมโครกรัมต่อ 1000 ไมโครกรัม = 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร = 0.001 กรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้นจะต้องชั่งผงของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินปริมาณ 0.002 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร

การคำนวณสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินจากสารละลายเข้มข้น สารคอร์ไดเซปิน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

- สารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × V = 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{20 \times 2}{1000}$$

V = 0.04 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.04 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.96 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{40 \times 2}{1000}$$

V = 0.08 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.08 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.92 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{60 \times 2}{1000}$$

V = 0.12 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 1.2 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.88 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{80 \times 2}{1000}$$

V = 0.16 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.16 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.84 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

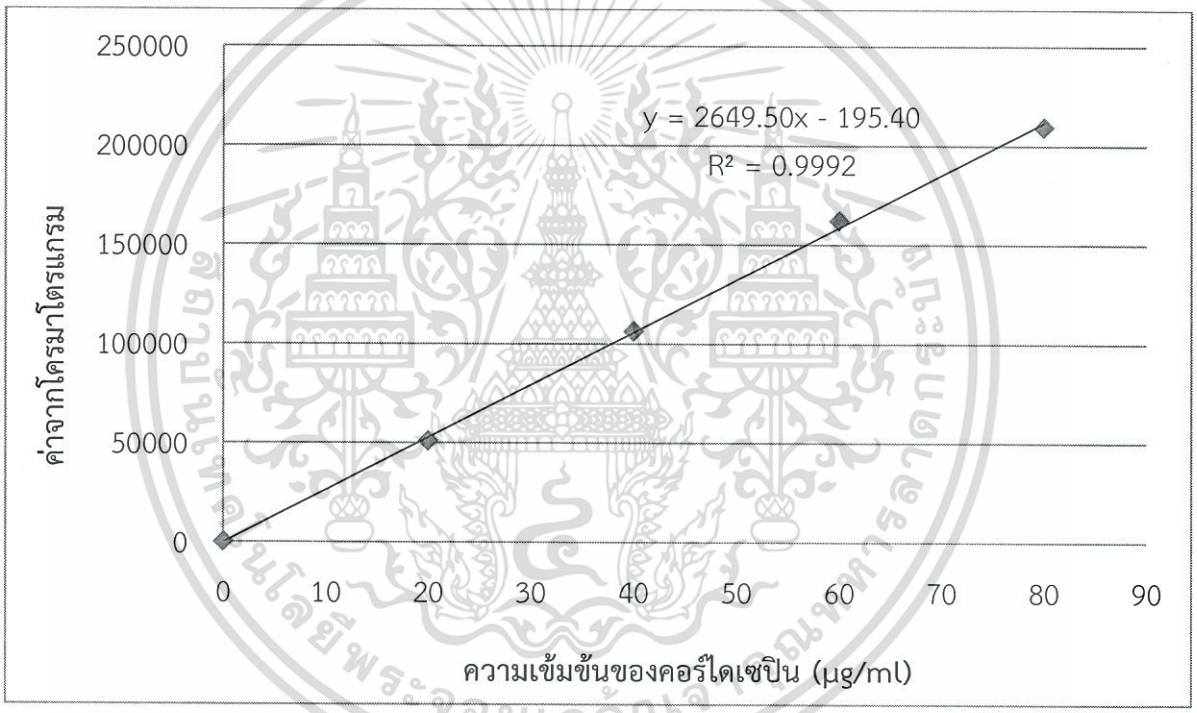
1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{100 \times 2}{1000}$$

V = 0.2 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.80 มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณคอร์ไดเซปินจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานสารคอร์ไดเซปิน

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากสารตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินมาคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$X = \frac{Y + 195.40}{2649.50}$$

โดย Y คือ ค่าที่ได้จากโครมาโตแกรม

X คือ ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน

สารอะดีโนซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solutions) สารอะดีโนซีน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องการสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

จะได้ว่า 1000 × 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 1 มิลลิลิตร

= 1,000,000 ไมโครกรัมต่อ 1000 ไมโครกรัม = 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร = 0.001 กรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้นจะต้องชั่งผงของสารมาตรฐานอะดีโนซีนปริมาณ 0.002 กรัม ละลายในเอทานอล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

การคำนวณสารมาตรฐานอะดีโนซีนจากสารละลายเข้มข้น สารอะดีโนซีน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

- สารมาตรฐานอะดีโนซีน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × V = 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{20 \times 2}{1000}$$

V = 0.04 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานอะดีโนซีน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.04 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.96 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานอะดีโนซีน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × V = 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{40 \times 2}{1000}$$

V = 0.08 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานอะดีโนซีน 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.08 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.92 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานอะดีโนซีน 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{60 \times 2}{1000}$$

V = 0.12 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานอะดีโนซีน 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 1.2 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.88 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานอะดีโนซีน 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร × V = 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

$$V = \frac{80 \times 2}{1000}$$

V = 0.16 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานอะดีโนซีน 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.16 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.84 มิลลิลิตร

- สารมาตรฐานอะดีโนซีน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × V = 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร × 2

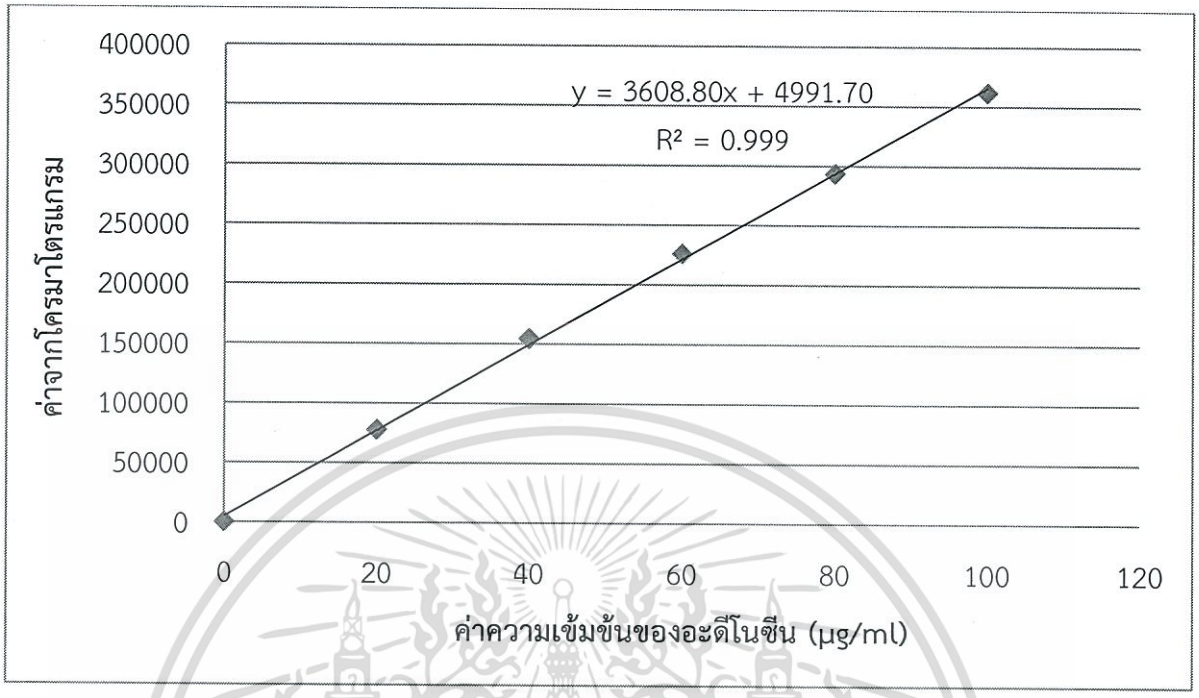
$$V = \frac{100 \times 2}{1000}$$

V = 0.2 มิลลิลิตร

ดังนั้นหากต้องการเตรียมสารมาตรฐานอะดีโนซีน 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต้องใช้สารละลายเข้มข้น (Stock Solution) 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมเอทานอลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถะสูง 1.80 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณสารอะดีโนซีนจากกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานสารอะดีโนซีน

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากสารตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนมาคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$X = \frac{Y - 4991.70}{3608.80}$$

โดย Y คือ ค่าที่ได้จากโครมาโตแกรม

X คือ ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการคัดเลือกหัวเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่ชั่วโมงที่ 24 – 144 ชั่วโมง ในที่มืดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เวลา	Mean	N	Std. Deviation	Variance
24	0.1000	3	0.1732051	.030
48	1.5667	3	1.6862186	2.843
72	5.2000	3	1.0816654	1.170
96	9.4000	3	0.5567764	.310
120	9.9333	3	0.2516611	.063
144	8.5667	3	0.1527525	.023
Total	5.7944	18	4.0167989	16.135

ตารางที่ ง-2 ค่าการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยในการคัดเลือกหัวเชื้อ ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่ชั่วโมงที่ 24 – 144 ชั่วโมง

		Subset for alpha = 0.05		
เวลา	N	1	2	3
24	3	0.1000[c]		
48	3	1.5667[c]		
72	3		5.2000[b]	
144	3			8.5667[a]
96	3			9.4000[a]
120	3			9.9333[a]
Sig.		.059	1.000	.088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-3 ค่าการวิเคราะห์ของค่า pH ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

แหล่งคาร์บอน	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	3	5.8967[b]	
ข้าวสังข์หยด	3		6.0700[a]
Control	3		6.0800[a]
Sig.		1.000	.596

หมายเหตุ Control คือไม่มีข้าวใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ง-4 ค่าการวิเคราะห์ของค่า pH ในอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

แหล่งคาร์บอน	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	3	5.8100[b]	
Control	3		6.1600[a]
ข้าวสังข์หยด	3		6.1633[a]
Sig.		1.000	.746

หมายเหตุ Control คือ ใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ง-5 ค่าการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในสภาวะอาหารแข็งหลังเติมหัวเชื้อ

แหล่งคาร์บอน	N	Subset for alpha = 0.05
		1
ข้าวสังข์หยด	3	62.2295
Control	3	62.3225
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	3	62.6220
Sig.		.823

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-6 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย ในอาหารเหลว ที่ชั่วโมงที่ 72 – 168 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	เวลา	Mean	Std. Deviation	N
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	72	26.109777	3.8194200	3
	96	19.009450	6.7410480	3
	120	17.281357	1.7426030	3
	144	29.964520	9.5125615	3
	168	23.473167	4.0248596	3
	Total	23.167654	6.8669356	15
ข้าวสังข์หยด	72	21.127327	12.3148083	3
	96	18.160139	14.4104510	3
	120	30.777443	10.3029801	3
	144	17.173937	3.3372191	3
	168	20.620883	3.0062667	3
	Total	21.571946	9.7165626	15
Control	72	12.483825	5.1240236	3
	96	12.836113	1.7182206	3
	120	7.689527	.8663365	3
	144	9.062929	4.5917089	3
	168	6.265878	1.9238657	3
	Total	9.667654	3.8817255	15
Total	72	19.906976	9.1528526	9
	96	16.668567	8.5094571	9
	120	18.582776	11.3306918	9
	144	18.733795	10.6752241	9
	168	16.786643	8.4274052	9
	Total	18.135751	9.3242362	45

หมายเหตุ Control คือไม่มีข้าวใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-7 ค่าการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย ในสภาวะอาหารเหลว

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2405.141[a]	14	171.796	3.629	.001
Intercept	14800.747	1	14800.747	312.630	.000
แหล่งคาร์บอน	1632.542	2	816.271	17.242	.000
เวลา	69.007	4	17.252	.364	.832
แหล่งคาร์บอน * เวลา	703.592	8	87.949	1.858	.105
Error	1420.280	30	47.343		
Total	18626.167	45			
Corrected Total	3825.421	44			
a. R Squared = .629 (Adjusted R Squared = .455)					

ตารางที่ ง-8 ค่าการวิเคราะห์แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารอะดีโนซีนในสภาวะอาหารเหลว

		Subset	
แหล่งคาร์บอน	N	1	2
Control	15	9.667654[b]	
ข้าวสังข์หยด	15		21.571946[a]
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	15		23.167654[a]
Sig.		1.000	.530

ตารางที่ ง-9 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารอะดีโนซีน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารแข็ง ที่ชั่วโมงที่ 72 – 360 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	เวลา	Mean	Std. Deviation	N
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	72	5.0620	1.90121	3
	144	5.6595	1.75363	3
	216	8.2661	2.16901	3
	288	6.8431	2.53545	3
	360	5.6993	1.13481	3
	Total	6.3060	2.02861	15
ข้าวสังข์หยด	72	6.1293	3.29715	3
	144	4.1587	1.26444	3
	216	3.4486	1.39260	3
	288	4.3351	.99655	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	360	3.2533	.73219	3
	Total	4.2650	1.84046	15
Control	72	6.9231	2.33688	3
	144	7.3984	2.16047	3
	216	4.5768	0.53663	3
	288	8.2515	5.22358	3
	360	5.0005	0.41904	3
	Total	6.4300	2.74754	15
Total	72	6.0381	2.37504	9
	144	5.7389	2.07530	9
	216	5.4305	2.54842	9
	288	6.4766	3.41002	9
	360	4.6510	1.30012	9
	Total	5.6670	2.40767	45

หมายเหตุ Control คือ ใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ ง-10 ค่าการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย ในสภาวะอาหารแข็ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	109.208[a]	14	7.801	1.604	.135
Intercept	1445.173	1	1445.173	297.250	.000
แหล่งคาร์บอน	44.341	2	22.171	4.560	.019
เวลา	16.978	4	4.244	.873	.492
แหล่งคาร์บอน * เวลา	47.890	8	5.986	1.231	.315
Error	145.855	30	4.862		
Total	1700.236	45			
Corrected Total	255.063	44			

a. R Squared = .428 (Adjusted R Squared = .161)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-11 ค่าการวิเคราะห์แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตสารอะดีโนซีน ในสภาวะอาหารแข็ง

แหล่งคาร์บอน	N	Subset	
		1	2
ข้าวสังข์หยด	15	4.2650[b]	
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	15		6.3060[a]
Control	15		6.4300[a]
Sig.		1.000	.879

หมายเหตุ Control คือ ใช้ข้าวสังข์หยดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้