ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว

Effect of nutrient conditions on the production of β-glucans from *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation

สุณัฏฐ์ณิชา บุญญาสถิตย์
สุดารัตน์ ประเสริฐไทย
อัจฉราภรณ์ เดือนกลาง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

โรงงานกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว

Effect of nutrient conditions on the production of β-glucans from *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation

สุณัฏฐ์ณิชา บุญญาสถิตย์
สุดารัตน์ ประเสริฐไทย
อัจฉราภรณ์ เดือนกลาง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149027
วัน,เดือน,ปี.....27 S.A. 2560

b.1829798X
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

Effect of nutrient conditions on the production of β-glucans from *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation

SUNATHNICHA BOONYASATID
SUDARAT PRASERTTHAI
ATCHARAPHORN DUEANKLANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลขององค์ประกอบอาหารของสูตรอาหารต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว Effect of Nutrient Conditions on the Production of β-glucans from *Agaricus brasiliensis* by Submerged Fermentation
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุณัฏฐ์ณิชา บุญญาสถิตย์ รหัสนักศึกษา 55051197 นางสาวสุดารัตน์ ประเสริฐไทย รหัสนักศึกษา 55051199 นางสาวอัจฉราภรณ์ เดือนกลาง รหัสนักศึกษา 55051216
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลขององค์ประกอบอาหารของสูตรอาหารต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว

ชื่อนักศึกษา นางสาวสุณัฏฐ์ณิชา บุญญาสถิตย์ รหัสนักศึกษา 55051197
นางสาวสุดารัตน์ ประเสริฐไทย รหัสนักศึกษา 55051199
นางสาวอัจฉราภรณ์ เดือนกลาง รหัสนักศึกษา 55051216

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

จากกการศึกษาผลขององค์ประกอบอาหารของสูตรอาหารต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว พบว่าสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมกับการผลิตหัวเชื้อเหลว คือ อาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ กลูโคส 20 เปปโตน 3 สารสกัดจากยีสต์ 3 และกล้วยหอม 140 โดยทำการเลี้ยงที่ 192 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลวศึกษาปริมาณกล้วยหอมที่เป็นส่วนหนึ่งขององค์ประกอบอาหารที่ปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร (ควบคุมสภาวะให้คงที่ อุณหภูมิ 25 องศสาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที และหัวเชื้อร้อยละ 10) เป็นเวลา 336 ชั่วโมง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 48, 96, 144,192, 240, 288 และ 336 จากการศึกษา พบว่าค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพที่เหมาะสม คือ 5.99±1.03 กรัมต่อลิตร (ปริมาณกล้วยหอม 140 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 240) และปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 38.88±1.03 กรัมต่อลิตร (ปริมาณกล้วยหอม 180 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 336)

คำสำคัญ : หัวเชื้อเหลว เห็ดกระดุมบราซิล สภาวะอาหารเหลว เอ็กตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์

Title	Effect of Nutrient Conditions on the Production of β-glucans from *Agaricus brasiliensis* by Submerged Fermentation	
Students	Miss Sunathnicha Boonyasatid	Student ID 55051197
	Miss Sudarat Prasertthai	Student ID 55051199
	Miss Atcharaphorn Dueanklang	Student ID 55051216
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2015	
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon	

Abstract

From the study of component of culture medium to produced beta-glucans from *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation, it is found that optimization of culture medium for stock culture was the fourth culture medium. *A. brasiliensis* was cultured in submerged fermentation in a medium containing (g/L) 20 of glucose, 3 of peptone, 3 of yeast extract and 140 of Bananas (*Musa sapientum* Linn.Fam) for 192 hours. After that, *A. brasiliensis* was cultured in the fourth culture medium for the optimized volume of banana in culture medium such as fractions (g/L) 100, 140 and 180 (Culture condition is stable at 25 °C on an incubator shaker at 150 rpm by using 10% of stock culture) for 336 hours. Then the samples were taken for lab analysis at 48, 96, 144, 192, 240, 288 and 336 hours, respectively. Our results show that the optimum production of dry mass basis is (5.99±1.03 g/L) in medium containing 140 g/L at 240 hours and maximum production of extracellular polysaccharides is (38.88±1.03 g/L) in medium containing 180 g/L at 336 hours

Keywords: stock culture, *Agaricus brasiliensis*, submerged fermentation, extracellular polysaccharides

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้สำเร็จด้วยความอนุเคราะห์และการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทำงาน ตลอดจนการตรวจทาน ตลอดจนชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งช่วยชี้แนวทางการแก้ไขปัญหา ปรับปรุงแก่ทางคณะผู้จัดทำ เพื่อให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการการสอบโครงงานพิเศษ และดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการการสอบโครงงานพิเศษ และสละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ที่ทำให้โครงงานพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจน บุคลากร และพี่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์สำหรับการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

สุณัฏฐ์ณิชา บุญญาสถิตย์
สุดารัตน์ ประเสริฐไทย
อัจฉราภรณ์ เดือนกลาง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2..1 เห็ด 3
2.1.1 องค์ประกอบของเห็ด 3
2.1.2 เห็ดกระดุมบราซิล 3
2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) 4
2.2.1 Internal Transcribed Spacers (ITS) 5
2.2.2 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่และ
วินิจฉัยโรคบางชนิด 5
2.3 เบต้ากลูแคน. 11
2.3.1 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน 11
2.3.2 การทำงานของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน 13
2.3.3 แหล่งที่พบเบต้ากลูแคนในธรรมชาติ 14
2.4 กล้วยหอม 15
2.4.1 กล้วยหอมทอง 15
2.5 กระบวนการเพาะเลี้ยง *Agaricus blazei* Murill โดยใช้วิธีการหมักในอาหารเหลว ... 18
2.5.1 การผลิตเส้นใยจากเห็ดกระดุมบราซิล 18
2.5.2 การทดลองแบบปัจจัยเดี่ยว 18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเบต้ากลูแคน 20
2.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดย
วิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS method) (Miller, 1959) 20
2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดย
วิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Phenol Sulfuric) (Dubois, 1956) 21
2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส(Sucrose) โดย
วิธีแอนโทรน (anthrone method) (Dreywood, 1946) 21
2.7 Factorial experiment 23
2.7.1 แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด 24
2.7.2 แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ 24
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 30
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 30
3.1.1 เชื้อ 30
3.1.2 สารเคมี 30
3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 30
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 31
3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เห็ดกระดุมบราซิล 31
3.2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 31
3.2.1.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม 31
3.2.2 การผลิตหัวเชื้อกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว 32
3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ 32
3.2.2.2 การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเหมาะสม
เพื่อผลิตหัวเชื้อ 32
3.2.2.3 การผลิตหัวเชื้อเหลว 32
3.2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว 32
3.2.3.1 ทดสอบความเหมาะสมองค์ประกอบของอาหารที่มี
การเติมกล้วยหอมในปริมาณแตกต่างกัน 32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 34
4.1 ผลศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เห็ดกระดุมบราซิล 34
4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 34
4.1.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิล
เมื่อมองด้วยตาเปล่า 34
4.1.1.2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิล
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 35
4.1.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม 36
4.2 ผลการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว 36
4.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงและเวลาที่แตกต่าง
โดยคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อทำการผลิตเชื้อ
เห็ดกระดุมบราซิล 36
4.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว 36
4.3.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมและ
เวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเห็ดกระดุมบราซิล 36
4.3.2 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมและ
เวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอ็กตร้าพอลิแซ็กคาไรด์ 37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 42
5.1 สรุปผลการวิจัย 42
5.2 ข้อเสนอแนะ 42
เอกสารอ้างอิง 44
ภาคผนวก 48
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 49
ภาคผนวก ข การเตรียมสารและการวิเคราะห์ 52
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลองและการคำนวณทางสถิติ 60

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพเบต้ากลูแคนจากแหล่งต่างๆ	15
4.1	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเมื่อทำการผลิตหัวเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง	37
4.2	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล โดยเติมกล้วยหอมลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณ100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง	38
4.3	ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล ที่มีการเติมกล้วยหอมปริมาณ 100 , 140, และ 180 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ ของอาหารที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง	38
1ข	การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	55
2ข	การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	56
3ข	การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	58
1ค	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเหลวที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง	60
2ค	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ในการผลิตหัวเชื้อเหลวโดยวางแผนการทดลองแบบ 4x7 factorial	61
3ค	การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้ง ของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตรที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเหลวโดยวิธี Turkey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95	62
4ค	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ที่มีการเติมกล้วยหอมในสูตรอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

5ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวางแผนการทดลองแบบ 3x7 factorial 64

6ค การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 65

7ค ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลีแซ็กคาไรด์ที่มีการเติมกล้วยหอมในอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณ 100, 140, และ 180 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง 66

8ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในสูตรอาหาร โดยมีปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวางแผนการทดลองแบบ 3x7 factorial ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์..... 67

9ค การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 68

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ดีเอ็นเอบริเวณ ITS	5
2.2	สายดีเอ็นเอเกลียวคู่พันกับโปรตีนและหดตัวเป็นสายโครมาตีน จนเห็นเป็นโครโมโซมในระยะเมตาเฟส	7
2.3	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction : PCR)	8
2.4	แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต	10
2.5	การจำแนกชนิดน้ำตาลกลูโคสตามตำแหน่งหมู่ OH	12
2.6	การเปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสแบบ D และ L-isomer	12
2.7	โครงสร้างอย่างง่ายของเบต้ากลูแคนที่ได้จากแหล่งต่างๆ.	13
2.8	ปฏิกิริยาเปลี่ยนสีของสารประกอบในวิธีฟีนอลซัลฟิวริก และวิธีแอนโทรน	23
4.1	ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง	34
4.2	ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 100 เท่า	35
4.3	ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 400 เท่า	35
4.4	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ	39
4.5	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ	39
4.6	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 180 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ	40
1ข	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่	53
2ข	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร	56
3ข	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร	57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4ข	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร	59

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เห็ดกระดุมบราซิลเป็นที่นิยมรับประทานกันในประเทศแถบตะวันออกหลายประเทศ โดยเห็ดกระดุมบราซิลได้รับการพิจารณาว่าเป็นเห็ดที่มีประโยชน์ คล้ายกับการใช้ธรรมชาติบำบัดในรูปแบบของสารสกัดจากสมุนไพร ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ในการป้องกันและการรักษาโรคมะเร็ง ในประเทศบราซิลใช้บริโภคเป็นสารสกัดเข้มข้นหรือชาและนิยมรับประทานเพื่อใช้ต่อต้านโรคหลายชนิด เช่น โรคเบาหวาน โรคไขมันในเลือดสูง โรคหลอดเลือดและโรคหัวใจ ซึ่งเห็ดกระดุมบราซิลประกอบไปด้วยสารที่สำคัญ ได้แก่ สารเบต้ากลูแคน และเส้นใยอาหารที่อุดมสมบูรณ์ รวมทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ สเตอรอยด์ กรดไขมันไม่อิ่มตัว ไคติน วิตามิน แร่ธาตุ กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน เอนไซม์อยู่มาก โมเลกุลหลักที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดกระดุมบราซิล คือ พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีน–พอลิแซ็กคาไรด์ (protein – polysaccharide) ที่ซับซ้อน ซึ่งมีเบต้ากลูแคนที่ได้จากดอกเห็ด (เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลูแคนเป็นกลุ่มน้ำตาลที่จับกันอย่างหนาแน่นด้วยน้ำตาลที่มีขนาดเล็ก เช่น กลูโคส หรือไซโลส) เส้นใยที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวหรือการกรองของเหลวหลังจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว โมเลกุลเหล่านี้ได้รับการพิสูจน์ว่ามีฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอก (antitumor) ยับยั้งการแบ่งตัว (anti-proliferative) ต้านความเป็นพิษต่อหน่วยพันธุกรรม (anti-genotoxic) และต้านการก่อกลายพันธุ์ (anti-mutagenic activities) ซึ่งเกี่ยวกับโมเลกุลขนาดเล็กที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดกระดุมบราซิล เหตุผลที่เลือกใช้การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวแทนการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง

คือ 1.) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณและค่าผลได้ที่แน่นอน

2.) การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวง่ายต่อการควบคุมปัจจัยทางกายภาพ

3.) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวจะสั้นกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็ง

โครงงานพิเศษนี้จะทำการศึกษาถึงผลขององค์ประกอบอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิลด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว โดยองค์ประกอบของสูตรอาหารจะแตกต่างกันที่ปริมาณแหล่งแมกนีเซียมและแหล่งโพแทสเซียม ซึ่งโครงงานพิเศษใช้กล้วยหอม ซึ่งกล้วยหอมอุดมไปด้วยแหล่งอาหารและธาตุที่สำคัญหลากหลายชนิด ทำการควบคุมสภาพแวดล้อมให้มีความเหมาะสมโดยสภาพแสดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใย ได้แก่ ความเร็วรอบของการเขย่า ซึ่งการเขย่านั้นจะช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจน เพื่อให้เชื้อใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม และการเจริญของเส้นใย ส่วนอุณหภูมิจะเป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาช่วยในการเจริญของเส้นใย

แต่ถ้าใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะไปยับยั้งการทำงานของเชื้อทำให้การเจริญของเส้นใยน้อยลง และพีเอชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องควบคุมเพราะถ้าควบคุมพีเอชไม่ดี จะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เป็นที่น่าพึงพอใจ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลวจึงจำเป็นต้องควบคุมพีเอชของอาหารให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม นอกจากนั้นเห็ดกระดุมบราซิลยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียรทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ว่องไว จึงสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือ สารพันธุกรรม ในภาวะที่อนุมูลอิสระมากเกินไปจะก่ออันตรายแก่ร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่า oxidative stress ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (arterosclerosis) เป็นสาเหตุร่วมในการเกิดโรคมะเร็ง (cancer) ทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น (wrinkle) และเกิดเป็นจุดสี (lipofuscin spot) เป็นต้น (Papus, 1998)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล
2. ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว
3. ทำการศึกษาแหล่งแมกนีเซียมและโพแทสเซียมจากอินทรีย์วัตถุที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล
2. ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว
3. ทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดกระดุมบราซิล
4. หาปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular polysaccharide) ของเห็ดกระดุมบราซิล และหาค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตสารเบต้ากลูแคนจากเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิลที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคมะเร็งได้ในปริมาณที่เหมาะสม
2. ทราบถึงสภาวะที่มีความเหมาะสมในการเจริญและการผลิตกลูแคนของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิล
3. สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในพอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ดกระดุมบราซิลได้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ด (ปิยธิดา, 2557)

เห็ดจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจที่อุดมไปด้วยองค์ประกอบทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน เลคติน และพอลิฟีนอล (Volman และคณะ, 2010 อ้างโดย ปิยธิดา) เห็ดได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารที่รับประทานได้และเป็นประโยชน์ต่อร่างกายในแง่ของการรักษาโรค เนื่องจากมีโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะองค์ประกอบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ในส่วนของดอกเห็ดและเส้นใย ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ดังกล่าวจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไป ยกตัวอย่าง เช่น เบต้ากลูแคนที่พบได้ในเห็ดหลายชนิดมีศักยภาพมากที่สุดในการเป็นสารต่อต้านมะเร็งและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Mizuno, 1996; Wasser, 2002 อ้างโดย ปิยธิดา) โดยเฉพาะเบต้ากลูแคนจากเห็ดหอมที่นิยมนำมาใช้รักษาโรคมะเร็ง

2.1.1 องค์ประกอบของเห็ด

โครงสร้างของเห็ดโดยทั่วไปประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นนอกสุดประกอบไปด้วยกลูแคนที่ละลายน้ำได้ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) ส่วนที่สองเป็นเนื้อเยื่อประกอบด้วย alkaline–solution glucan (α(1→ 3)-glucan) และชั้นในสุดประกอบด้วยส่วนที่เป็น alkaline–insolution glucan (β(1→ 3)-glucan) และไคนิน (chitin) จำนวนมาก(Pramanik และคณะ, 2005 อ้างโดย ปิยธิดา) โดยพบว่าที่ผนังเซลล์ของเห็ดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ร้อยละ 50-90 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเบต้ากลูแคน นอกจากนั้นเป็นพอลิแซ็กไรด์ชนิดอื่น เช่น ไกลโคเจน (glycogen) ไคนิน ไซแลน (xylan) และเซลลูโลส (celllose) (Synytsa และคณะ, 2009 อ้างโดย ปิยธิดา) นอกจากนี้ พบว่าที่ผนังเซลล์ของเห็ดมีกลูแคนบางชนิดจับอยู่กับโปรตีนด้วยเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเซลลูโลสกลายเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน (Leung และคณะ, 2006)

2.1.2 เห็ดกระดุมบราซิล

Agaricus blazei Murill (ABM) เป็นเห็ดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ในประเทศบราซิลเห็ดชนิดนี้มีชื่อว่า Cogumelo do Sol หรือ Himematsutae ในประเทศญี่ปุ่นเป็นเห็ดที่พบมากในประเทศบราซิล และมีการเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวางในประเทศญี่ปุ่น สำหรับใช้ในการผลิตยา ในอดีตมีการใช้เห็ดชนิดนี้ในการทดสอบการรักษาโรค เช่น โรคตับอักเสบ โรคเบาหวาน ผิวหนังอักเสบ โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ไขมันในเส้นเลือดสูง *Agariccus blazei* Murill มีคุณสมบัติเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันและการต่อต้านการกลายพันธุ์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับวิถีในชีวเคมีและเป็นสารตั้งต้นทางเคมีในปฏิกิริยาซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตยา (Firenzuoli และคณะ, 2007)

- ปี ค.ศ 1960 *Agaricus blazei* Murill ถูกค้นพบตามธรรมชาติในหมู่บ้านขนาดเล็กชื่อว่า Piedade ในพื้นที่ป่า Atlantic ใกล้กับ Tauape ในจังหวัด Sao Paolo ประเทศบราซิล
- ปี ค.ศ 1965 Takatoshi Furumato นักวิจัยชาวญี่ปุ่น เป็นผู้ค้นพบ
- ปี ค.ศ 1967 Belgian botanist Heinemann เป็นผู้พบความแตกต่างเกี่ยวกับ *Agaricus blazei* Murill

ลักษณะของ *Agaricus blazei* Murill

Agaricus L. มีหลายตระกูล (genus)
จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Agariaceae*
อันดับ (order) Agariales

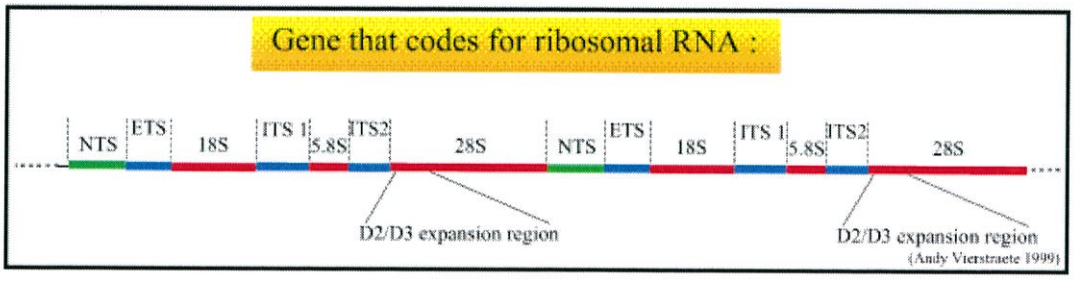
ลักษณะทั่วไป: ส่วนใหญ่ ดอกมีขนาดเล็ก สีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาล
ลักษณะทางโครงสร้าง: เป็นชั้นบางๆ ซีดหรือเมื่อยังอ่อนจะมีสีชมพู หลังจากนั้นจะมีสีน้ำตาลช็อคโกแลต และสีน้ำตาลเข้ม เบสิดิโอสปอร์มีลักษณะเรียบ *Agaricus* มีหลากหลายตระกูลแบ่งเป็น 3 ลักษณะย่อยตาม Heinemann คือ *Agaricus, Coniogaricus* และ*lanagaricus* แบ่งย่อยเป็น subgenus *Agaricus* ตามสายพันธุ์ของตัวอย่าง (Firenzuoli และคณะ, 2007)

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) (ณัฐวุฒิ, 2556)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือลำดับเบสของดีเอ็นเอช่วงหนึ่งเพื่อใช้บ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตๆ เช่นเชื้อรา หรืออาจหมายถึงตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโมเลกุลดีเอ็นเอ อาจพบอยู่บนตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA) ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ เราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ต่างๆ เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ และสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มาเป็นตัวบ่งชี้ความจำเพาะเจาะจงในลักษณะที่สนใจในจุลินทรีย์ได้ด้วย เช่น ในการจำแนกและการระบุชื่อของเชื้อราด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งในอดีตเราใช้เครื่องหมายบ่งชี้ทางรูปทางสัณฐานวิทยา (Morphological markers) เช่นดูลักษณะต่างๆที่เชื้อราแสดงออกมาภายนอกด้วยการสังเกต เช่น ลักษณะของสปอร์ ลักษณะสีของเชื้อราแต่การใช้บ่งชี้ทางรูปทางสัณฐานวิทยานี้มีข้อจำกัดที่สำคัญคือสภาพแวดล้อมที่เชื้อรา อาจเข้ามามีอิทธิพลต่อลักษณะที่แสดงออกได้ ทำให้ลักษณะที่พบอาจไม่เป็นลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรานั้นอย่างแท้จริง จึงมีการค้นหาเครื่องหมายบ่งชี้อื่นที่มีความถูกต้องแน่นอนกว่าการใช้การสังเกตลักษณะที่แสดงออกมาภายนอกแต่เพียงอย่างเดียว ได้แก่ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งเป็นการนำเอาดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องหมาย

2.2.1 Internal Transcribed Spacers (ITS)

ITS คืออนุกรมวิธานของเชื้อรา เป็นดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITS) ของ ribosomal DNA (rDNA) มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดรวมทั้งเชื้อรา และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆของ rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้



รูปที่ 2.1 ดีเอ็นเอบริเวณ ITS

ที่มา: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/cell.html

2.2.2 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่และวินิจฉัยโรคบางชนิด (Alberts และคณะ, 1983)

ดีเอ็นเอ หรือ Deoxyribonucleic (DNA) เป็นสารพันธุกรรมทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอจะประกอบด้วยหน่วยย่อยพื้นฐานที่เรียกว่า “นิวคลีโอไทด์” อันเป็นชุดของโมเลกุลฟอสเฟต น้ำตาลเพนโตส และสารเคมีที่มีสมบัติเป็นด่างหรือ “เบส” 1 ตัว ซึ่งเบสจะมีอยู่ 4 ชนิดคือ adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T) ลักษณะโครงสร้างของดีเอ็นเอประกอบขึ้นจากสายชุดนิวคลีโอไทด์ 2 สายที่มาพันเข้าด้วยกันเป็นลักษณะเกลียวคู่หรือบันไดเวียน โดยมีเบสที่เรียงรายอยู่ตามสายแต่ละสาย แต่ละสายทำหน้าที่ยึดจับระหว่างสายทั้งสอง และปรากฏว่าสายส่วนที่มีเบส A จะจับคู่สร้างพันธะกับเบส T และส่วนที่มีเบส G จะจับคู่เบส C ซึ่งการจับคู่กันนี้เรียกว่าเป็นเบสคู่สม และแต่ละส่วนบนสายดีเอ็นเอนี้เองที่เป็นที่อยู่ของ “ยีน” (gene) ซึ่งเป็นส่วนที่บรรจุข้อมูลสำหรับการสร้างโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยยีนที่ต่างกันก็จะมีตำแหน่งที่อยู่และการเรียงลำดับของเบสบนตัวมันแตกต่างกันไป

2.2.2.1 อาร์เอ็นเอ สามารถเป็นแหล่งข้อมูลพันธุกรรมได้

ในปี พ.ศ.2513 ได้มีผู้ค้นพบว่าเชื้อไวรัสบางชนิดมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ RNA หรือ Ribonucleic acid) ซึ่งไวรัสสามารลอกรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์เจ้าบ้านได้ ตัวอย่างไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ ได้แก่ เชื้อไวรัสเอชไอวี ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ โดยปกติอาร์เอ็นเอจะถูกลอกรหัสมาจากดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการถอดรหัส

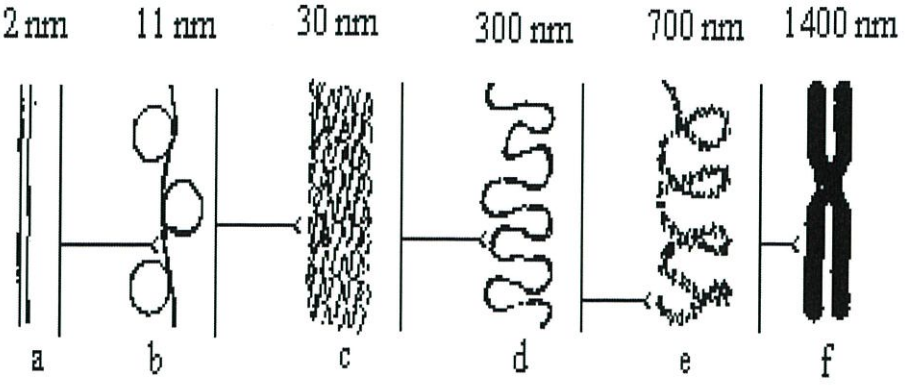
สร้างโปรตีนเป็นการถ่ายทอดรหัสทางพันธุกรรมออกมาเป็นลักษณะภายนอกของสิ่งมีชีวิต อาร์เอ็นเอประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับดีเอ็นเอ แต่มีความแตกต่างในส่วนของน้ำตาลเพนโตสซึ่งในดีเอ็นเอเป็นน้ำตาล deoxyribose ส่วนในอาร์เอ็นเอเป็นชนิด ribose และเบสที่พบในอาร์เอ็นเอจะประกอบด้วยเบส 4 ชนิดเช่นกัน โดยมีเบส 3 ชนิดที่เหมือนกับดีเอ็นเอ คือ A, G, C และเบสที่ต่างกับดีเอ็นเอคือ uracil (U) ซึ่ง u จะจับคู่กับเบส A (แทนเบส T ในดีเอ็นเอ)

2.2.2.2 โครโมโซม

สาร DNA ซึ่งเป็นข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต จะมีขนาดยาวแตกต่างกันมากในกรณีของเชื้อไวรัสอาจมีจีโนม (genome) หรือข้อมูลพันธุกรรมทั้งหมดเป็น DNA หรือ RNA เท่านั้น และอาจเป็นสายคู่หรือสายเดี่ยวที่เป็นเส้นยาว (linear) วงแหวน (circular) หรือเป็นชิ้นแยกกัน (segments) ซึ่งต่างจากจีโนมของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งจะเป็นโปรตีนร่วมกับกันอยู่กับสาย DNA และมีรูปร่างที่เด่นชัด ซึ่งเรียกว่าโครโมโซม (chromosome) (ดังรูปที่ 2.2) เชื้อแบคทีเรีย จะมีโครโมโซม ประกอบด้วย DNA สายเกลียวคู่ชนิดวงแหวนจับรวมอยู่กับโปรตีนหลายชนิด เป็นกลุ่มเรียกว่านิวคลีออยด์ (nucleoid) แต่จะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสห่อหุ้ม ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สาย DNA จะอยู่ในลักษณะที่จับรวมกับฮีสโตน (histone) และโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยมีการพันและหดตัวของสาย DNA เพื่อให้สามารถบรรจุเข้าในส่วนนิวเคลียสของเซลล์ได้ นอกจากนิวเคลียสแล้ว ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงยังมียีนที่อยู่ในส่วนของ organelle อื่นๆ เช่นในพืชจะมียีนอยู่ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และคลอโรพลาส (chloroplast) อีกส่วนหนึ่งเป็นต้น

2.2.2.3 เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่(Polymerase Chain Reaction :PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอ ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA



รูปที่ 2.2 สายดีเอ็นเอเกลียวคู่พันกับโปรตีนและหดตัวเป็นสายโครมาตินจนเห็นเป็นโครโมโซมในระยะเมตาเฟส
ที่มา: Freifelder (1985)

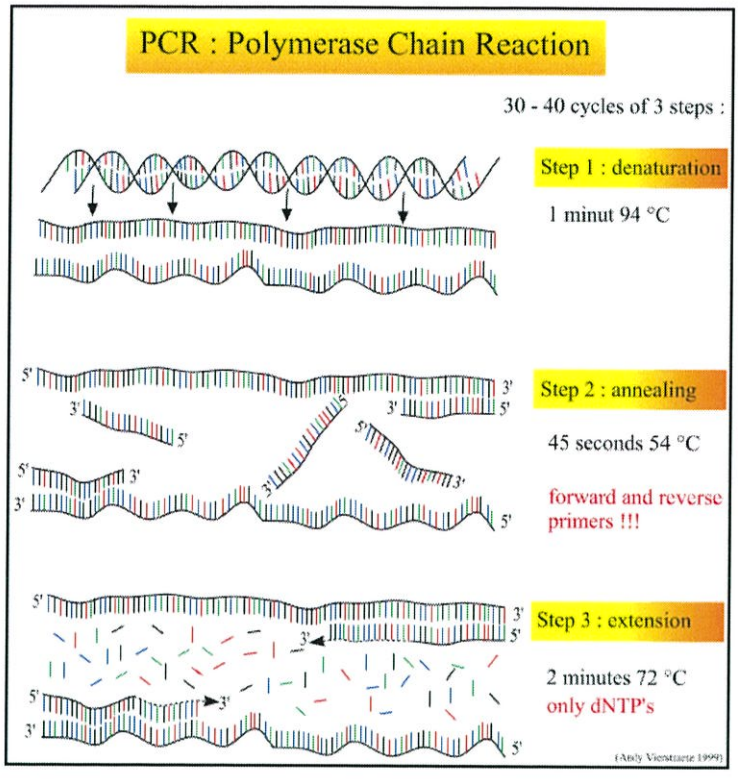
2.2.2.3.1 หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรกเรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กันซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ซึ่งเอ็นไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 - 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน



รูปที่ 2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction :PCR) ที่มา: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า

2.2.2.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่

เนื่องจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลองจึงต้องมีการเติมสารเคมี และสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพเมอร์จำเพาะ

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น พีเอชและเกลือต่างๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg++) อยู่ด้วย

5. Template คือดีเอ็นเอต้นแบบ หรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ หรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนด จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

2.2.2.3.3 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัท ผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

2.2.2.3.4 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่

ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ หลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตร้าไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น (รูปที่ 2.4)

2.2.2.4 ประโยชน์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ในการตรวจวินิจฉัยโรค

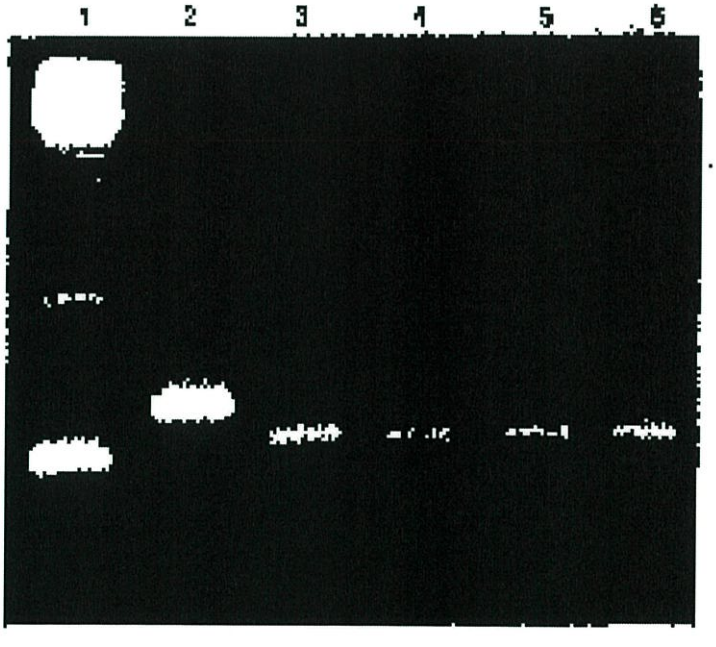
ปัจจุบันนี้นับได้ว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีน ทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว และเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย

ประโยชน์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (เช่น โรคเอดส์,

วัณโรค,มาเลเรีย) การตรวจหายีนก่อมะเร็ง (เช่น มะเร็งเต้านม,มะเร็งลำไส้ใหญ่) ซึ่งประโยชน์ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ทางการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ทางด้านการเกษตรการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรคสายพันธุ์พืชต้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมทั้งศึกษายีนกับตัวอื่นๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ ซึ่งเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ นี้ช่วยให้เข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชและ พืชอาศัย ตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่นๆ

ขณะนี้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็น อุตสาหกรรมส่งออกที่ ทำรายได้ให้กับประเทศไทย4-5 หมื่นล้านบาทต่อปี แต่ในปัจจุบันนี้เกษตรกรเริ่มประสบปัญหาจาก โรคระบาดในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งมีผลต่อผลผลิตกุ้งส่งออก ทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ถึงปีละ 1-2 หมื่นล้านบาท สาเหตุของโรคระบาดในกุ้งที่พบส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งต้องใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ ในการตรวจสอบทำให้สามารถป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันท่วงที นอกจากนี้การคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่ดีเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ซึ่งมีความแปรปรวนพันธุกรรม (genetic diversity หรือ Variation) สูงจะไม่สามารถดำเนินไปได้ถ้าไม่ใช้วิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพและถูกต้องถึงระดับพันธุกรรม



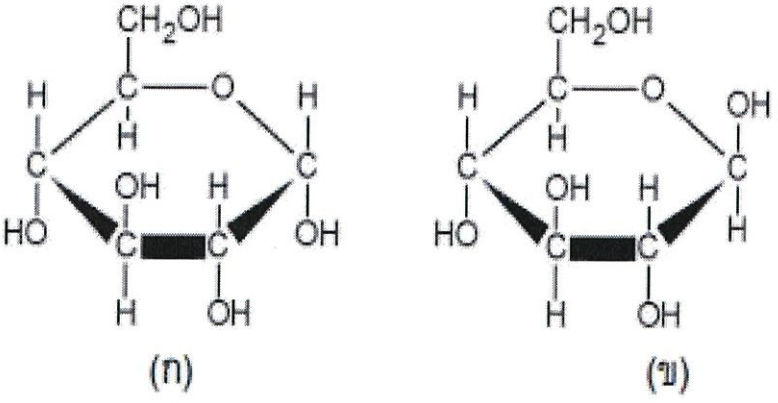
รูปที่ 2.4 แถบดีเอ็นเอที่แยกบนแผ่นวุ้นโดยวิธี agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสี ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

2.3 เบต้ากลูแคน

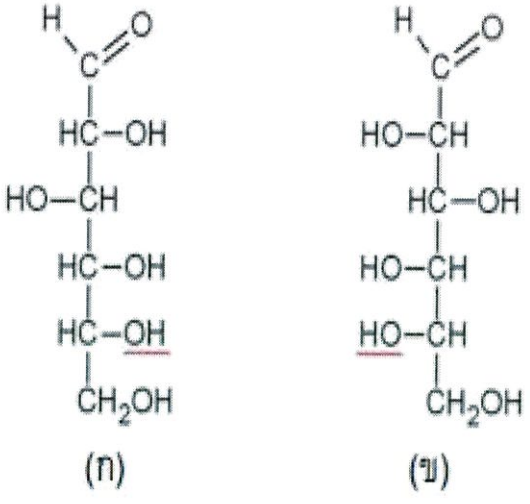
เบต้ากลูแคนเป็นสารประกอบประเภทน้ำตาลหลายโมเลกุลหรือที่เรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร ช่วยในระบบการย่อยอาหารและระบบขับถ่าย เบต้ากลูแคน ประกอบขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กลูแคนหรือน้ำตาลกลูโคสนั้น แบ่งออกเป็น อัลฟากลูแคนและเบต้ากลูแคน เบต้ากลูแคนมีคุณสมบัติมหัศจรรย์ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกายใช้ป้องกันโรคติดเชื้อจากจุลชีพต่างๆ ทั้งยังมีคุณสมบัติอื่นๆ ที่สำคัญ คือ ลดระดับไขมันคอเลสเตอรอลในเลือด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สำหรับประโยชน์ที่เหนือกว่าสารอาหารอื่นๆ คือ สรรพคุณในการป้องกันและต้านเซลล์มะเร็ง เมื่อร่างกายได้รับเบต้ากลูแคน เม็ดเลือดขาวจะถูกกระตุ้นให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (อานนท์, 2548) เบต้ากลูแคนถูกค้นพบครั้งแรกจากไซโมซาน (zymosan) ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces ceravisiae*) ซึ่งทดสอบแล้วพบว่า มีฤทธิ์ในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน ต่อต้านเชื้อชนิดต่างๆ แต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าส่วนใดคือส่วนที่ออกฤทธิ์จนกระทั่งมีการสกัดเพิ่มเติมจนพบว่าส่วนที่กระตุ้นภูมิต้านทาน คือ β-(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan ซึ่งเกิดจากน้ำตาลกลูโคสโมเลกุลเชิงเดี่ยวที่เป็นรูปวงแหวนมาเชื่อมต่อกันโดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของกลูโคสโมเลกุลที่ 1 จับกับกลูโคสตัวถัดไปในคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ด้วยพันธะไกลโคซิดิก ส่วนเบต้า (β) คือส่วนของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ชี้ขึ้นด้านบน (รูปที่ 2.5) และสำหรับ D คือ หมู่ –OH ของคาร์บอนอะตอมตัวที่ 5 ของกลูโคส อยู่ทางขวามือ เป็นโครงสร้างแบบ D-isomer แต่ถ้า –OH อยู่ทางซ้ายมือ จะเป็นโครงสร้างแบบ L-isomer ซึ่งในธรรมชาติส่วนใหญ่จะมีโครงสร้างแบบ D-isomer (Malinow, 1996 อ้างโดย ปิยธิดา) (รูปที่ 2.6)

2.3.1 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน

เบต้ากลูแคนเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาเรียงต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-1,3, เบต้า-1,4 หรือ เบต้า-1,6 ดังนั้นคำว่า “เบต้ากลูแคน” จึงมีความหลากหลายมาก (รูปที่ 2.7) เช่น เบต้ากลูแคนจากแบคทีเรีย หรือสาหร่าย จะมีโครงสร้างที่เป็นสายยาวเชื่อมกันด้วยเบต้า-1,3 อย่างเดียว ส่วนเบต้ากลูแคนจากรา เห็ด หรือยีสต์ จะมีโครงสร้างที่เป็นสายหลักที่เชื่อมกันด้วยเบต้า-1,3 และสายแขนงที่เชื่อมกันด้วยเบต้า-1,6 และเบต้ากลูแคนจากธัญพืช เช่น ข้าวโอ๊ต หรือข้าวบาร์เลย์ จะมีโครงสร้างที่เป็นสายหลักที่เชื่อมกันด้วยเบต้า-1,4 และสายแขนงที่เชื่อมกันด้วยเบต้า-1,3



รูปที่ 2.5 การจำแนกชนิดน้ำตาลกลูโคสตามตำแหน่งหมู่ OH
(ก) ตำแหน่ง –OH ที่อยู่ด้านล่างเรียกว่า α-D-glucose
(ข) ตำแหน่ง –OH ที่อยู่ด้านบนเรียกว่า β-D-glucose
ที่มา: Malinow (1996)



รูปที่ 2.6 การเปรียบเทียบโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสแบบ D และ L-isomer
(ก) โครงสร้างแบบ D-isomer (ข) โครงสร้างแบบ L-isomer
ที่มา: Malinow (1996)

ชนิดของเบต้ากลูแคน	โครงสร้าง	ลักษณะ
แบคทีเรีย		Curdlan: สายยาวเบต้า 1,3 (ไม่มีแขนง)
รา		Schizophyllan: สายยาว β1,3 สายแขนง β1,6
ยีสต์		Beta Glucan: สายยาว β1,3 สายแขนง β1,6
ธัญพืช		ข้าวบาร์เลย์, โอ๊ต: สายยาว β1,3 หรือ β1,4

รูปที่ 2.7 โครงสร้างอย่างง่ายของเบต้ากลูแคนที่ได้จากแหล่งต่างๆ
ที่มา: https://beta1-3dglucan.com.

2.3.2 การทำงานของเบต้ากลูแคนต่อระบบภูมิคุ้มกัน

เบต้ากลูแคนจะถูกย่อยที่บริเวณผนังลำไส้เล็กส่วนไอเลียมที่เรียกว่า Peyer's Patches โดย เซลล์มาโครฟาจ (Macrophage) หรือเซลล์ต่อสู้โรค ให้กลายเป็นแท่ง (fragment) เล็กๆ ของ β -1,3/ 1,6-D-glucan พอลิแซ็กคาไรด์จะไปจับกับตัวรับ (Receptor) ของ Neutrophils (เซลล์เม็ดเลือดขาวที่คอยกำจัดเชื้อโรค) ซึ่งจะทำให้ Neutrophils มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคมากขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการค้นหาและจับกับสิ่งแปลกปลอมเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอมในร่างกายได้เร็วขึ้น ราวทศวรรษที่ 50 Nicholas DiLuzio จากมหาวิทยาลัย Tulane ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมจนพบว่า สารที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน Zymosan ที่จริงแล้ว คือเบต้ากลูแคน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง β-1,3-D-glucan ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ตรงโมเลกุลของออกซิเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับ หมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของอีกกลุ่มหนึ่ง

นักวิทยาศาสตร์เริ่มศึกษาถึงความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเบต้ากลูแคนเรื่อยมาจนก้าวเข้าสู่ยุคปี 80 Joyce K. Czop จากมหาวิทยาลัย Harvard ได้ค้นพบตัวรับที่จำเพาะต่อเบต้ากลูแคนบนผิวเซลล์ของมาโครฟาจ โดยตัวรับดังกล่าวเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 1 ไมครอน ซึ่งพบอยู่บนผิวเซลล์มาโครฟาจตั้งแต่เริ่มสร้างจากไขกระดูกจนตาย

Joyce K. Czop อธิบายว่า เมื่อสายอัลฟา-เฮลิก ซึ่งเป็นโครงสร้างสามมิติของเบต้ากลูแคน ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลประมาณ 7 หน่วยเข้าไปจับที่ตัวรับบนผิวเซลล์ ก็จะไปกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจให้อยู่ในสภาวะตื่นตัว เพื่อทำหน้าที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อไป แต่ในภาวะปกติแล้วเซลล์มาโครฟาจส่วนใหญ่มักจะอยู่ในสภาวะสงบ ซึ่งหมายความว่าระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ของร่างกายจะไม่ทำงานจนกว่าจะตรวจพบสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา หรือสารเคมีต่างๆ แต่หากร่างกายของเราได้รับเบต้ากลูแคนอยู่เป็นประจำแล้ว เบต้ากลูแคนเหล่านี้จะคอยกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ ให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพอยู่ตลอดเวลา ซึ่งกระบวนการ

ในการกระตุ้นเซลล์มาโครฟาจของเบต้ากลูแคน นั้นมีอยู่หลายทาง เช่น กระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวมาโครฟาจ อยู่ในสภาวะที่เตรียมพร้อมและตื่นตัวอยู่เสมอ ช่วยควบคุมการหลั่ง cytokines เช่น อินเตอร์ลิวคิน เพื่อกระตุ้นการสื่อสารระหว่างเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน
มีส่วนช่วยในกระตุ้นการหลั่ง colony-stimulating factors เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างและการเจริญเติบโตของเม็ดเลือดขาว เช่น Neutrophils และ Eosinophils จากไขกระดูก
กระบวนการเหล่านี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ เซลล์มาโครฟาจ ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาสู่ร่างกายและก่อให้เกิดประโยชน์แก่ร่างกายในด้านต่างๆ ดังนี้

1.) ต้านเซลล์มะเร็ง ลดความเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งต่างๆ

2.) บรรเทาอาหาร และฟื้นตัวได้เร็วหลังจากทำเคมีบำบัด

3.) ลดอาการภูมิแพ้และไข้หวัด

4.) บรรเทาการติดเชื้อ และการอักเสบจากเชื้อชนิดต่างๆ

5.) ช่วยให้บาดแผลหายเร็วขึ้น

เบต้ากลูแคน สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้ จากการศึกษาของ Peter W. Mansell ในคนไข้ที่เป็นมะเร็งผิวหนัง 9 ราย พบว่าขนาดของเซลล์มะเร็งที่ผิวหนังของคนไข้ลดลง เมื่อได้รับการฉีดเบต้ากลูแคนเข้าไป ร่วมกับผลการทดลองจากการฉายรังสีในระดับที่เป็นอันตรายให้แก่หนูที่ได้รับเบต้ากลูแคนเป็นประจำพบว่าร้อยละ 70 ของหนูทั้งหมดที่ทำการทดลองไม่ได้รับอันตรายจากผลของรังสี ซึ่งข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเบต้ากลูแคนได้เป็นอย่างดี

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีถึงผลของเบต้ากลูแคน ที่มีต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ผ่านทางเซลล์มาโครฟาจ อย่างไรก็ตามกลไกการลำเลียงเบต้ากลูแคน เข้าสู่ร่างกายยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน โดยสันนิษฐานว่า การลำเลียงดังกล่าวนั้นน่าจะเกิดขึ้นที่ Microfold ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์เนื้อเยื่อบุผิว ที่ดัดแปลงไปทำหน้าที่พิเศษที่เรียกว่า เอ็ม-เซลล์ (M-cell) โดยเซลล์เหล่านี้พบอยู่ภายใน Peyer's patches ของต่อมน้ำเหลืองตามทางเดินอาหาร หลังจากที่เบต้ากลูแคนถูกนำเข้าสู่เอ็ม-เซลล์แล้ว เอ็ม-เซลล์จะส่งต่อเบต้ากลูแคนให้กับเซลล์มาโครฟาจอีกที

2.3.3 แหล่งที่พบเบต้ากลูแคนในธรรมชาติ

พบได้ในพืชบางชนิด เช่น เห็ด พบในผักสมุนไพรต่างๆ เช่น ว่านหางจระเข้ โสม ข้าวโอ๊ต ชะเอมเทศยีสต์ (ยีสต์ดำ ยีสต์ขนมปัง) ข้าวบาร์เลย์ สาหร่าย และราเส้นใย เป็นต้น สำหรับเบต้ากลูแคนจากยีสต์ดำ เกิดจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ดำโดยเฉพาะ ซึ่งตัวยีสต์ดำจะสร้างใยอาหารเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างเป็นเบต้า-1,3/1,6-D-glucan (แปลว่า มีตำแหน่งเชื่อมต่อหลักที่ตำแหน่ง 1 และ 3 ของโมเลกุล และมีตำแหน่งเชื่อมต่อรองที่ตำแหน่ง 1 และ 6 ของโมเลกุล)

ตารางที่ 2.1 แสดงตารางเปรียบเทียบประสิทธิภาพเบต้ากลูแคนจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของเบต้ากลูแคน	การเกิดสมดุล	เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาว	เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของNK เซลล์	ประสิทธิภาพต่อเซลล์มะเร็ง	การรอดชีวิตในระยะยาว
1.ยีสต์ขนมปัง	+++++	+++++	400 เปอร์เซ็นต์	+++++	80 เปอร์เซ็นต์
2.เห็ดกินได้	+++	+++	200 เปอร์เซ็นต์	+++	35 เปอร์เซ็นต์
3.รำข้าวบาร์เลย์	ไม่เกิด	++	ไม่เพิ่ม	ไม่พบการศึกษา	ไม่พบการศึกษา
4.บริเวอร์ยีสต์	ไม่เกิด	+	ไม่พบการศึกษา	ไม่พบการศึกษา	ไม่พบการศึกษา
5.ยีสต์ดำ	ไม่เกิด	++	ไม่พบการศึกษา	ไม่พบการศึกษา	ไม่พบการศึกษา

ที่มา : โดยดร.วิทยา กดุมภะ (สำนักพิมพ์เพชรประกาย, 2555), https://beta1-3dglucan.com.

2.4 กล้วยหอม

กล้วยหอมเป็นผลไม้ที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิด คือ กล้วยหอมทอง และกล้วยหอมเขียว ซึ่งมีลักษณะผลคล้ายกัน และขนาดใกล้เคียงกัน แต่จะแตกต่างกันที่ลักษณะของลำต้น และกล้วยหอมเขียวจะสุกรับประทานได้ในขณะที่ผลยังเขียว ส่วนกล้วยหอมทองจะเริ่มสุก และรับประทานได้เมื่อผลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (เบญจมาศ, 2545) กล้วยหอม เป็นไม้ล้มลุกชนิดหนึ่ง จัดเป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยคุณค่าสารอาหารครบถ้วนตามหลักทางโภชนาการ เช่น มีวิตามิน ใยอาหารที่ช่วยในการขับถ่าย มีสารแทนนิน ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Escherichia coli* เป็นต้น กล้วยหอมจัดเป็นผลไม้เมืองร้อนสามารถปลูกได้เกือบทุกประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้นหลายแห่ง สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกกล้วยหอมได้ทั่วทุกภาค (พีรศักดิ์ และคณะ, 2544)

2.4.1 กล้วยหอมทอง

2.4.1.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ (เบญจมาศ, 2545)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Musa Sapientum*, *Musa* (โครโมโซม AAA group)

ชื่อสามัญ : Gros Michel, Hom Thong Bana

ชื่อท้องถิ่น : กล้วยหอม, กล้วยหอมทอง

อาณาจักร: Plantae

Order : Scitamineae

Family : Musaceae

Genera : *Musa*

Section : Eumusa

2.4.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (เบญจมาศ, 2545)

1) ราก รากกล้วยหอมทองเป็นแบบ adventitious root ที่แตกออกจากหน่อ ซึ่งหน่อจะแตกออกจากเหง้า รากมีความยาวได้มากกว่า 5 เมตร แทงลึกลงดินได้ถึง 5-7.5 เมตร

2) ลำต้น มีลำต้นจริงที่เป็นหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน มีลำต้นเทียมที่อยู่เหนือดิน สูงประมาณ 2.5-3.5 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 20 เซนติเมตร กาบลำต้นด้านนอกมีสีเขียวและมีแถบประสีดำ ด้านในสีเขียวอ่อนและมีเส้นลายสีชมพู

3) ใบ ใบเป็นใบเดี่ยวแบบขนาน มีก้านใบที่มีร่องค่อนข้างกว้างและมีปีก เส้นกลางใบมีสีเขียว ใบยาวได้มากถึง 3 เมตร

4) ดอก/ปลี ดอกหรือปลี จะแทงออกจากหยวกตรงกลางปลายยอด เมื่อแทงออกช่วงแรกจะตั้งตรงและค่อยๆโค้งงอลงด้านล่าง ก้านเครือมีขนอ่อนปกคลุม ปลีมีรูปไข่ค่อนข้างแหลมยาว และมีปลายแหลม มีกาบหุ้มด้านนอกสีแดงอมม่วง ด้านในสีแดงชีด ปลีกล้วยหอมทองมีความยาวประมาณ 1-1.5 เมตร

5) ผล กล้วยหอมทองเครือหนึ่งมีประมาณ 6-10 หวี แต่ละหวีมี 10-16 ผล หรือมากกว่าหากดินมีความสมบูรณ์ ผลกว้าง 3-4 เซนติเมตร และยาว 21-25 เซนติเมตร ปลายผลมีจุก เปลือกบางแต่หนากว่ากล้วยไข่ ผลดิบมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลืองทอง แต่จุกที่ปลายผลยังเป็นสีเขียว แล้วค่อยเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองเมื่อสุกมาก เนื้อสีเหลืองเข้ม มีรสหวาน และมีกลิ่นหอมแรง

6) ลักษณะเด่น แตกหน่อมาก ให้ผลเร็ว ตกเครือตลอดปี เครือไม่ใหญ่มาก มีราว 5-8 หวี ผลใหญ่ยาวเหมือนกล้วยหอมอื่นๆ ปลายผลเป็นติ่ง ผลสุกสีเหลืองสวย (ศศิวิมล และคณะ, 2552)

2.4.1.3 คุณค่าทางอาหารของกล้วยหอมทอง

กล้วยมีเบต้าแคโรทีน ที่ให้พลังงานและยังอุดมไปด้วยน้ำตาลธรรมชาติ 3 ชนิด คือ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส รวมกับเส้นใยและกากอาหาร กล้วยจะช่วยเพิ่มพลังงานให้กับร่างกายทันทีที่รับประทาน จากงานวิจัยพบว่ากินกล้วยแค่ 2 ผล สามารถเพิ่มพลังงานให้อย่างเพียงพอกับการออกกำลังกายอย่างเต็มที่ได้นานถึง 90 นาที กล้วยยังมีคุณประโยชน์อีกหลากหลาย ทั้งไฟโตเคมิคัลที่ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความแก่ ป้องกันมะเร็ง มีเอนไซม์ช่วยในการย่อยอาหาร ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้ทำงานหนักลดลง ในกล้วยดิบยังมีฤทธิ์ในการขับพิษสูง ส่วนกล้วยสุกช่วยทำให้ร่างกายสร้างสารภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นกว่าปกติ นอกจากนี้ในกล้วยนั้นจะมีวิตามินบี 1 และบี 2 ที่ช่วยในการเร่งการเผาผลาญน้ำตาลและไขมัน ทั้งยังช่วยฟื้นฟูร่างกายการจากเหนื่อยล้า อีก

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ทั้งยังมีโพแทสเซียมช่วยในการขับโซเดียม ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวการที่ทำให้ความดันเลือดสูง โดยขับออกทางปัสสาวะและส่งผลให้ลดการบวมของร่างกาย

1) คุณค่าทางโภชนาการของกล้วยหอมทองสุก (100 กรัม) (เบญจมาศ, 2545)

ความชื้น	77.19 กรัม
ไขมัน	0.73 กรัม
โปรตีน (N x 6.25)	1.82 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	18.42 กรัม
เถ้า	0.65 กรัม
แคลเซียม	14.27 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	21.09 มิลลิกรัม
เหล็ก	8.71 มิลลิกรัม
เบต้าแคโรทีน	589.40 มิลลิกรัม
กรดแอสคอบิค	11.06 มิลลิกรัม

2) กล้วยหอม 100 กรัม ประกอบด้วย (กรมอนามัย กระทรวงสาธารณะสุข)

พลังงาน	120 กิโลแคลอรี่
น้ำ	ไม่ระบุ
น้ำตาล	14 กรัม ประมาณ 2.8 มิลลิลิตร
ใยอาหาร	3.0 กรัม
เบต้าเคโรทีน	ไม่ระบุ
วิตามินซี	ร้อยละ 17
โพแทสเซียม	ไม่ระบุ

3) คุณประโยชน์ของกล้วยทางโภชนาการ ต่อ 100 กรัม มีดังนี้

พลังงาน	89	กิโลแคลอรี่	วิตามินบี9	20	ไมโครกรัม
คาร์โบไฮเดรต	22.84	กรัม	โคลีน	9.8	มิลลิกรัม
น้ำตาล	12.23	กรัม	วิตามินซี	8.7	มิลลิกรัม
เส้นใย	2.6	กรัม	ธาตุเหล็ก	0.26	มิลลิกรัม
ไขมัน	0.33	กรัม	ธาตุแมกนีเซียม	27	มิลลิกรัม
โปรตีน	1.09	กรัม	ธาตุแมงกานีส	0.27	มิลลิกรัม
วิตามินบี1	0.031	มิลลิกรัม	ธาตุฟอสฟอรัส	22	มิลลิกรัม
วิตามินบี2	0.073	มิลลิกรัม	โพแทสเซียม	358	มิลลิกรัม
วิตามินบี3	0.665	มิลลิกรัม	ธาตุโซเดียม	1	มิลลิกรัม
วิตามินบี5	0.334	มิลลิกรัม	ธาตุสังกะสี	0.15	มิลลิกรัม
วิตามินบี6	0.4	มิลลิกรัม	ธาตุฟลูออไรด์	2.2	ไมโครกรัม

149027

2.5 กระบวนการเพาะเลี้ยง *Agaricus blazei* Murill โดยใช้วิธีการหมักในอาหารเหลว

2.5.1 การผลิตเส้นใยจากเห็ดกระดุมบราซิล

หัวเชื้อ (stock culture) เก็บรักษาไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง (slant) ที่มีสูตรอาหาร คือ สารสกัดจากมอล์ต–เด็กซ์โทรส–วุ้น (malt extract-dextrose-agar; MDA) และทำการเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 เดือน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียงบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การบ่มจะเตรียมการโดยการเติมเส้นใยที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผิวหน้าเอียงที่เตรียมขึ้นใหม่ (แผ่นวุ้นที่เป็นเส้นใยจำนวน 5 แผ่น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) เติมลงในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 4 วัน ในอุณหภูมิคงที่ 28 องศาเซลเซียส อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลมีองค์ประกอบพื้นฐานของอาหารบางส่วนที่ใช้สำหรับการผลิตมวลชีวภาพและพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเห็ดกระดุมบราซิลที่เพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวและมีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังต่อไปนี้: กลูโคส 40 เปปโตน 3 สารสกัดยีสต์ 3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4.H_2O$) 0.5 และ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.3 สำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวใช้อาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้อาหารเหมือนกันกับที่เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกับที่จะใช้ชักนำก่อนช่วงระยะเวลาหนึ่ง (pre-culture) ได้ทำการเติมเชื้อแล้ว (1.0 มิลลิลิตรต่อลิตร) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าทีความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน จะมีการสร้างเส้นใยขึ้นมาอีกครั้งจากอาหารเหลว นำมากรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่าผลได้ของมวลชีวภาพ ส่วนที่เหลือจากการกรองจะทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (dinitrosalicylic method) (Carvajal และคณะ, 2011)

2.5.2 การทดลองแบบปัจจัยเดี่ยว

การเพาะเลี้ยง *Agaricus blazei* Murill โดยใช้วิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว ใช้เครื่องเขย่า เป็นตัวช่วยในกระบวนการหมักซึ่งปัจจัยใช้คือ พีเอช อุณหภูมิ ความเร็วรอบของการเขย่า และ ปริมาณเชื้อที่เติมลงในอาหาร ทั้ง 4 ปัจจัยนี้จะส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว (Cao และคณะ, 2014) ดังนี้

2.5.2.1 พีเอชของอาหาร

ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อใส่เชื้อ *Agaricus blazei* Murill ในรูปของสารละลายในฟลาสก์ ขนาด 200 มิลลิลิตร รวมทั้งอาหารแบบเหลวที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร โดยเติมเชื้อร้อยละ 5 และปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ จากนั้นนำไป

บ่ม 3 วัน โดยให้ฟลาสก์เขย่าตลอดเวลา อุณหภูมิคงที่ โดยอุณหภูมิที่ใช้หมัก คือ 25 องศาเซลเซียส และใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีพบว่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก คือ พีเอชที่ 6.5

2.5.2.2 ความเร็วรอบการเขย่า

ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ใส่เชื้อ *Agaricus blazei* Murill ในรูปของสารละลายในฟลาสก์ ขนาด 200 มิลลิลิตร รวมทั้งอาหารแบบเหลวที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร เติมเชื้อร้อยละ 5 จากนั้นนำไปบ่ม 3 วัน โดยให้ฟลาสก์เขย่าตลอดเวลา โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Agaricus blazei* Murill คือ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมินี้ในการหมัก และใช้ความเร็วรอบ 90, 120, 150, 180 และ 210 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยความเร็วรอบที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก คือ 150 รอบต่อนาที

2.5.2.3 ปริมาณของเชื้อ

ระหว่างการทดลองแบบปัจจัยเดี่ยว โดยพิจารณาปริมาณของเชื้อที่เติมลงไปในอาหารหมักมี 5 การทดลอง คือ ร้อยละ 4, 6, 8, 10 และ 12 ตามลำดับ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ใส่เชื้อ *Agaricus blazei* Murill ในรูปของสารละลายในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร รวมทั้งอาหารแบบเหลวที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร เติมเชื้อตามปริมาณข้างต้น จากนั้นนำไปบ่ม 3 วัน โดยให้ฟลาสก์เขย่าตลอดเวลา อุณหภูมิที่ใช้หมัก คือ 25 องศาเซลเซียส และใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการวัดน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพและปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ โดยปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก คือ ร้อยละ 6

2.5.2.4 อุณหภูมิ

เมื่อทำการทดลองศึกษาอุณหภูมิทั้ง 5 อุณหภูมิ คือ 19, 22, 25, 28 และ 31 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาแบบปัจจัยเดี่ยวเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมัก *Agaricus blazei* Murill โดยใช้วิธีการหมักในอาหารเหลวและทำการวัดเช่นเดียวกับข้างต้นภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เติมเชื้อที่ร้อยละ 5 ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลวอยู่ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่ม 3 วัน โดยให้ฟลาสก์เขย่าอยู่ตลอดเวลาความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยอุณหภูมิที่ใช้หมัก คือ 19, 22, 25, 28 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการหมัก คือ 25 องศาเซลเซียส ทำการหมักจนได้ปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักนำสารละลายที่ได้จากการหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500 รอบต่อนาที เทสารละลายทิ้งเหลือเฉพาะเส้นใยจากนั้นล้างเส้นใย 4-5 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นนำไปทำให้แห้งโดยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นได้เส้นใยที่แห้งมีลักษณะเป็นก้อนกลมๆ ทำการตรวจสอบน้ำตาล คือ น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลซูโครส โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค วิธีฟีนอลซัลฟิวริก วิธีการเปรียบเทียบความเข้มของสี (Roe colorimetric) ซึ่งปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ น้ำตาลทั้งหมด ลบ น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์

2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเบต้ากลูแคน

2.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (DNS method) (Miller, 1959)

เป็นวิธีที่ถูกอ้างถึงโดย Summer และ Sisler (1944) และประยุกต์ใช้โดย Miller (1959) ซึ่งเทคนิคนี้มีความเป็นไปได้ในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์เป็นน้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde) อิสระ หรือหมู่คีโตน (ketone) ภายในโมเลกุล และแสดงคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้ในอาหารที่เป็นด่างสามารถรีดิวซ์ กรด-3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5 dinitroslicylic acid) ให้เป็นกรด 3-อะมิโน-5-ไนโตรซาลิกซาลิค (3-amino-5-nitrosalicylic acid) ขณะเดียวกันหมู่อัลดีไฮด์จะถูกออกซิไดส์ไปกลายเป็นกรดแอลโดนิก (aldonic acid) กรด 3-อะมิโน-5-ไนโตรซาลิไซลิค ซึ่งมีสีส้มและความเข้มข้นของสีขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ โซเดียมไฮดรอกไซด์จะให้กลูโคสในปฏิกิริยาโดยกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิคในอาหารที่เป็นด่าง

วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วิธีนี้จะมีความไวในการตอบสนองจาก 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของน้ำตาลรีดิวซ์ใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสเป็นสารละลายมาตรฐานในการสร้างกราฟ (เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับการดูดกลืนแสง) และคำนวณผลโดยใช้สมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

สารเคมี : สารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิค เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิกรัม) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติมดีเอ็นเอส (DNS) 10 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต 200 กรัม เติมฟีนอล 0.2 กรัม และ Na_2SO_3 0.5 กรัม

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (อารี, 2555)

น้ำตาลรีดิวซ์เป็นน้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde : CHO) อิสระและสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้ น้ำตาลรีดิวซ์สามารถรีดิวซ์กรดไดไนโตรซาลิไซลิคให้กลายเป็นกรด 3–อะมิโน–5–ไนโตรซาลิกไซลิก (3–amino–5–nitrosalicylic acid) ซึ่งมีสีน้ำตาลแดงได้ ขณะเดียวกันหมู่อัลดีไฮด์ในน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl) ดังสมการ

$$\text{Aldehyde group} \xrightarrow{\text{oxidation}} \text{carboxyl group}$$

$$\text{3,5 –dinitrosalicylic acid} \xrightarrow{\text{reduction}} \text{3–amino,5–nitrosalicylic acid}$$

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีนี้ ทำได้ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สุดท้าย แล้วเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง

2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Phenol Sulfuric) (Dubois, 1956)

เป็นวิธีที่ยึดตามหลักความเป็นจริงของตัวอย่างหรือสารประกอบของน้ำตาลรวมทั้งเมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) โดยกลุ่มของน้ำตาลรีดิวซ์อิสระและกลุ่มอิสระที่อาจเกิดขึ้น เมื่อนำมาทดสอบกับสารฟีนอลและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นทำปฏิกิริยากันเกิดเป็นสีส้ม–เหลือง และมีความเสถียร วิธีนี้สามารถเกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลลัพธ์ที่เหมาะสมและสามารถทำซ้ำได้ การเปลี่ยนสีของสารละลายช่วงที่สามารถเห็นได้อย่างชัดเจนและสัมพันธ์กับสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลในตัวอย่าง การไฮโดร์ไลต์สารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้ด้วยการให้ความร้อนในสภาวะพีเอชที่เป็นกรดสูง ปฏิกิริยานี้มีอนุพันธ์เฟอราล (furan) เป็นองค์ประกอบ เมื่อลดส่วนประกอบของสารฟีนอลิคทำให้เกิดสารที่มีสีเกิดขึ้น ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ความยาวคลื่นที่ 490 นาโนเมตร วิธีนี้จะมีความไวในการตอบสนองที่ 10-100 ไมโครกรัม ของน้ำตาลทั้งหมดและกำหนดปริมาณในการสร้างกราฟ (เส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับการดูดกลืนแสง) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส หรือเพนโตส เป็นสารมาตรฐานและคำนวณผลโดยใช้สมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

นำสารสกัดที่ได้มาเจือจาง จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับสารละลายฟีนอล (phenol) ร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เขย่าให้สารละลายผสมเข้ากันดี จากนั้นตั้งทิ้งไว้อีก 10-20 นาที จะได้สารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar) คำนวณหาน้ำตาลนอนรีดิวซ์ โดยการนำปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.6.3 การวิเคราะห์โดยวิธีแอนโทรน (anthrone method) (Dreywood, 1946)

แอนโทรนเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยารีดักชันของสาร anthraquinone ซึ่งเป็นสารที่ถูกแยกออกเป็นสารแรก เป็นเหมือนกับตัวทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดโดย Dreywood (1946) เพราะสารละลายน้ำตาลในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นอยู่ในรูปสีฟ้าอมเขียวและนับตั้งแต่นั้นมาวิธีแอนโทรนจึงนิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางและเป็นตัวทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อสีของปริมาณน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาแอนโทรนจะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำและปฏิกิริยาการดึงน้ำออกของกรดซัลฟิวริกเข้มข้นจากคาร์โบไฮเดรตพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมอยู่กับน้ำตาลรีดิวซ์อิสระจะถูกทำลายจากปฏิกิริยาการดึงน้ำออกและเปลี่ยนเป็นเฟอร์ฟูรัลโดยเพนโตสและเปลี่ยนเป็น hydroxymethylfurfural โดยเฮกโซส (รูปที่ 2.8)

สารเหล่านี้จะรวมตัวกับแอนโทรนเป็น hydroxyanthracene (9,10-dihydro-9-oxo anthracene) กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าอมเขียวซึ่งสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 620

นาโนเมตร วิธีนี้มีความไวต่อแสงจาก 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน ในการสร้างกราฟมาตรฐานและหาสมการเส้นตรงเพื่อหาจำนวนตัวอย่าง

คุณสมบัติของน้ำยาแอนโทรน

1. มีความไวต่อปฏิกิริยามาก ทำปฏิกิริยาในทางบวกกับกระดาษกรอง (เซลลูโลส)

2. ความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะแปรผันกับความเข้มของสี ดังนั้นวิธีการนี้ควรใช้สำหรับการวัดเชิงปริมาณของไกลโคเจน อินนูลิน และน้ำตาลในเลือด

3. วิธีการนี้สามารถใช้ในการทดสอบเชิงคุณภาพ ตั้งแต่ความแตกต่างของน้ำตาลที่ทำการดึงน้ำออกด้วยอัตราที่แตกต่างกันและสร้างสีที่หลากหลาย

การวิเคราะห์โดยวิธีแอนโทรน (Trelyan และ Haarrison, 1952)

การเตรียมสารเคมีสำหรับหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี anthrone method

1. กรดซัลฟิวริกร้อยละ 75: เตรียมโดยใส่น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับ ปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่แท่งเหล็กวางในอ่างน้ำบนแท่นกวน (ทำในตู้ดูดควัน) ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น (ร้อยละ 95-97) ปริมาตร 390 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปรับปริมาตรที่มีน้ำกลั่นอย่างช้าๆ และระมัดระวัง ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายแอนโทรน : ชั่งแอนโทรน 0.5 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติม absolute ethanol 5 มิลลิลิตร คนให้พอดีละลายแล้วเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 75 จากนั้นกลั้วบีกเกอร์ด้วย absolute ethanol 5 มิลลิลิตร เทลงในขวดปรับปริมาตรอีกครั้ง และปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 ใส่แท่งเหล็ก ปิดฝาแล้วห่อขวดด้วยฟลอยด์ (ห้ามโดนแสง) จากนั้นนำไปตั้งบนแท่นกวน เพื่อให้แอนโทรนละลายจนหมด

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการ

1. เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน / สารละลายพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง

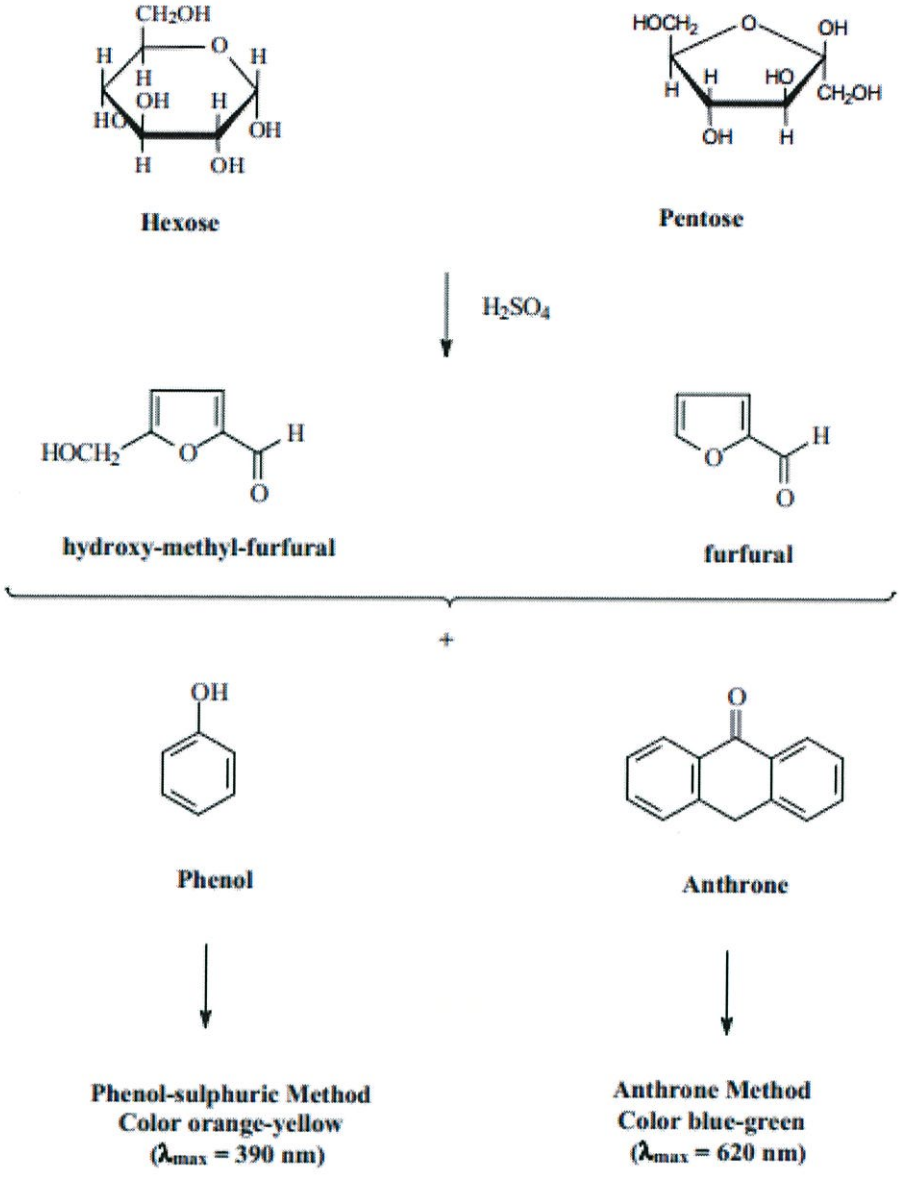
2. นำหลอดไปแช่น้ำในอ่างน้ำแข็ง รอจนสารละลายเย็นลง

3. เติมสารละลายแอนโทรนที่แช่เย็นไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน (ขณะเติมและเขย่าต้องให้หลอดอยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา)

4. แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งจนทุกหลอดเย็นลงจนถึงประมาณ 0 องศาเซลเซียส

5. นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานของกลูโคส



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาเปลี่ยนสีของสารประกอบในวิธีฟีนอลซัลฟิวริก และวิธีแอนโทรน
ที่มา: Dreywood (1946)

2.7 Factorial experiment (มนัส, 2553)

Factorial experiment เป็นการทดลองที่ทรีตเมนต์ถูกจัดเป็นกลุ่มของปัจจัย ดังนั้น Factorial experiment จึงไม่ได้เป็นแบบแผน เป็นเพียงการจัดกลุ่มทรีตเมนต์ตามปัจจัยเท่านั้น จึงต้องใช้ร่วมกับแผนแบบต่างๆ เช่น CRD RCB หรือ LS

2.7.1 หลักการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

แบบแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design ; CRD) เป็นแบบแผนการทดลองที่ใช้เมื่อคาดหวังว่าทุกหน่วยทดลองมีความสม่ำเสมอ (Uniform) จึงให้ทุกหน่วยทดลองมีโอกาสที่จะได้รับทรีตเมนต์ใดทรีตเมนต์หนึ่งเท่าๆกัน โดยทำการสุ่มตลอดคราวเดียว

คุณลักษณะสำคัญของแบบแผนการทดลอง CRD

1. การควบคุมความคลาดเคลื่อน (Error Control) สำหรับ CRD นั้นต้องควบคุมให้ทุกหน่วยทดลองมีความสม่ำเสมอ กล่าวคือต้องควบคุมทุกหน่วยทดลองให้ได้รับสิ่งต่างๆ เหมือนๆกันยกเว้นทรีตเมนต์
เป็นต้นว่า วัสดุทดลอง สภาพแวดล้อม การปฏิบัติดูแลรักษา ตลอดจนระยะเวลาตั้งแต่ก่อนและหลังได้รับทรีตเมนต์จนถึงการวัดค่าลักษณะที่สนใจศึกษา

2. การสุ่มทรีตเมนต์ให้กับหน่วยการทดลองสำหรับ CRD นั้น ทุกหน่วยทดลองมีโอกาสที่จะได้รับทรีตเมนต์ใดทรีตเมนต์หนึ่งเท่าๆกัน โดยทำการสุ่มตลอดในคราวเดียว

3. จำนวนซ้ำสำหรับ CRD ไม่มีข้อจำกัดแต่ละทรีตเมนต์จะมีซ้ำเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ แต่ควรมีจำนวนซ้ำมากพอเพื่อให้มีความน่าเชื่อถือ โดยจำนวนซ้ำควรมีมากพอที่จะทำให้ค่า Degree of Freedom ของ Error ในตาราง ANOVA ไม่น้อยกว่า 12

2.7.2 แบบแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์

แบบแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) นำมาใช้การจัดกลุ่ม หรือ บล็อก (block) หน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอไว้ใน block เดียวกันก่อน ต่าง block จะมีความแตกต่างกัน การกระทำเช่นนี้ได้ต้องทราบทิศทางความแปรปรวนระหว่างหน่วยทดลอง และต้องมีเพียงทิศทางเดียว RCB มีเงื่อนไขที่สำคัญคือต้องจัดให้มีจำนวนหน่วยทดลองในแต่ละ Block เท่ากับจำนวนทรีตเมนต์ และให้หน่วยทดลองภายใน Block มีความสม่ำเสมอหรือมีความแตกต่างกันน้อยที่สุด

คุณลักษณะสำคัญของแบบแผนการทดลอง RCB

1. การควบคุมความคลาดเคลื่อน (Error Control) สำหรับ RCB นั้นต้องควบคุมให้ทุกหน่วยทดลองในแต่ละ Block มีความสม่ำเสมอ ต่าง มีความแตกต่างกัน

2. การสุ่มทรีตเมนต์ให้กับหน่วยการทดลองสำหรับ RCB นั้น ทุกหน่วยทดลองในแต่ละ Block มีโอกาสที่จะได้รับทรีตเมนต์ใดทรีตเมนต์หนึ่งเท่าๆกัน โดยทำการสุ่มที Block จนครบทุก Block

3. จำนวนซ้ำสำหรับ RCB แต่ละทรีตเมนต์ต้องมีจำนวนซ้ำเท่ากันซึ่งเท่ากับจำนวน Block และควรมีจำนวนซ้ำมากพอที่จะทำให้ค่า Degree of Freedom ของ Error ในตาราง ANOVA ไม่น้อยกว่า 12

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Conrad และคณะ, 2012) อ้างโดย (ณัฐวุฒิ, 2556) ITS คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นสากลในการระบุชื่อเชื้อรา ทีม Fungal Barcoding Consortium ร่วมมือกันทำงานเพื่อค้นหาศักยภาพดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้เป็นสากล (Universal DNA marker) ที่มีประสิทธิภาพในแง่ความเหมาะสม สะดวก และรวดเร็ว เพื่อใช้ตรวจสอบและเปรียบเทียบโดยใช้ตำแหน่งของ nuclear ribosomal RNA ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิด 18S (SSU), ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิด 28S (LSU) รวมทั้งตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) หรือ ดีเอนเอของลำดับเบสในบริเวณ ITS 1 และ 2 รวมกับไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิด 5.8S (5.8S) และ protein coding region ซึ่งประกอบด้วย largest subunit of RNA polymerase II อาร์พีบีวัน (RPB1), อาร์พีบีทู (RPB2) และ mini-chromosome maintenance proteins 7 (MCM7) ผลการศึกษาพบว่า protein coding region มีประสิทธิภาพการเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ดี แต่ให้ผลการทำ ให้ผลผลิต PCR (The polymerase chain reaction) ไม่ดีและความสำเร็จในการหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ไม่ดี เมื่อเทียบกับ nuclear ribosomal RNA ต่างๆ และใน nuclear ribosomal RNA เหล่านี้พบว่า ดีเอนเอของลำดับเบสในบริเวณไอทีเอส 1 และ 2 รวมกับ ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ชนิด 5.8S (5.8S) หรือ ITS ให้ผลในการจัดจำแนกเชื้อราที่ดีที่สุด ในแง่ความผันแปรกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆ ของ nuclear ribosomal RNA ต่างๆ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และชนิดเชื้อราต่างๆได้ รวมทั้งประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบสของเชื้อรา ดังนั้นทีมนักวิจัยของ Fungal Barcoding Consortium ได้เสนอให้ ITS (Internal Transcribed Spacer) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเครื่องหมายสากลเหมาะสมที่สุดและใช้ได้ดีครอบคลุมในเบื้องต้นในการระบุและการยืนยันกลุ่มเชื้อราส่วนใหญ่ อีกทั้งใช้ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ต่อยอดสำหรับงานอนุกรมวิธานด้านเชื้อราในเชิงลึกต่อไป ผลงานวิจัยดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ภายใต้ชื่อเรื่อง “Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi” ใน วารสาร PNAS ปี 2012

Dulay และคณะ (2015) ในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวของเห็ดที่บริโภคได้ตามธรรมชาติในแถบประเทศฟิลิปปินส์ โดยสารอาหารมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว เส้นใยของมวลชีวภาพของเห็ดทั้ง 4 ชนิด หลังการบ่ม 10 วัน อาหาร sabouraud dextrose broth (SDB) ให้เส้นใยที่สูงของเห็ดทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษา ยิ่งกว่านั้นคืออาหาร SDB มีลักษณะจำเพาะของสารอาหารที่ประกอบอยู่ และพีเอช ยังเป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญของเห็ด เนื่องจากพีเอชจะส่งผลต่อโครงสร้างและลักษณะทางกายภาพของเซลล์เห็ด มีรายงานเกี่ยวกับ พีเอชที่เหมาะสมของอาหารแข็งสำหรับการเจริญของเส้นใยควรอยู่ที่พีเอช 8 ส่วนข้อแตกต่างอธิบายไว้ว่าบัฟเฟอร์ที่มีความจำเพาะของอาหารที่ใช้และชนิดของ

หัวเชื้อแต่ละสายพันธุ์ แต่อย่างไรข้อแตกต่างเหล่านี้ก็ไม่มีผลมากนัก เพราะเส้นใยก็ยังคงอยู่ได้และยังผลิตมวลชีวภาพที่พีเอชพื้นฐาน (พีเอช 4 และ 9) ของอาหารที่ใช้ศึกษาได้

ในส่วนประกอบของ SDB ที่ใช้ ได้แก่ เปปโตน (10 กรัมต่อลิตร) ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เด็กซ์โตสใช้เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งพีเอชสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 5.6 ในการทดลองจะเห็นได้ว่า เปปโตนมีความสำคัญในการเพิ่มการเจริญของ *Pleurotus ostreatus* และ *G. lucidum* ส่วนค่าผลได้ของมวลชีวภาพจะแตกต่างกันตามแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลฟรุกโตส มอสโตส และกลูโคส ซึ่ง *Ganoderma applanatum* จะมีค่าผลได้สูงกว่า เพราะใช้น้ำตาลแลคโตสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าผลได้ของมวลชีวภาพลดลงได้ด้วยการเพิ่มอัตราการเขย่า ทั้งนี้อัตราการเขย่าที่สูงมีความสำคัญต่อการลดลงของเส้นใยมวลชีวภาพของ *Tricholoma matsutake* แต่จะเป็นผลดีต่อการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ สิ่งที่ทำให้ค่าผลได้มีค่าต่ำสามารถอธิบายได้จากเส้นใยได้รับอันตรายในทางตรงกันข้ามอาจมีผลต่อการเจริญเมื่อเก็บไว้ที่อัตราการเขย่าที่สูง นอกจากนี้พีเอชของอาหารและอัตราการเขย่าแล้ว ค่าผลได้ของมวลชีวภาพที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงยังสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสามารถเทียบกับอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง *G. lucidum* (30-35 องศาเซลเซียส) และ *Antrodia cinnamomea* (25-28 องศาเซลเซียส) สำหรับการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการหมัก โดยใช้อาหารเหลว

Cao และคณะ (2014) ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเร็วรอบการเขย่าที่มีผลต่อการหมักในอาหารเหลวซึ่งความเร็วรอบการเขย่าสามารถเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงได้ โดยปกติแล้ว *Agaricus* ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญและใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) แต่ในทางกลับกันแรงเฉือนที่เกิดจากการปั่นเหวี่ยงจะไปลดการจับกลุ่มของเส้นใยเห็ดเกิดลักษณะเป็นลูกบอลเล็กๆ เพื่อลดการสะสมของเชื้อที่มากเกินไป จากการศึกษาความเร็วรอบการเขย่าในช่วง 90-150 รอบต่อนาที ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์หรือน้ำหนักแห้งของเส้นใยจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่า รวมทั้งปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่มีทิศทางที่ลดลง แต่เมื่อความเร็วเกิน 150 รอบต่อนาที แสดงให้เห็นถึงปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์หรือน้ำหนักแห้งของเส้นใยมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเร็วเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นปริมาณน้ำตาลที่เหลือเริ่มเพิ่มขึ้น เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง คือ 150 รอบต่อนาที ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ มีค่าเท่ากับ 4.949 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.078 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่างการรวมตัวของเมแทบอไลท์ (metabolite) และการเจริญของ *Agaricus blazei* Murill ซึ่งมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน โดยช่วงพีเอช 5.5-6.5 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพและปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์จะเพิ่มขึ้น แต่ถ้าพีเอช มากกว่า 6.5 น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์จะลดลง ส่วนการเจริญของ *Agaricus blazei* Murill โดยเปรียบเทียบระหว่างพีเอช 6 และ 7 โดย *Agaricus blazei* Murill จะเจริญได้ดีที่ พีเอช 6.5 ซึ่งปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของ

มวลชีวภาพมีค่าเท่ากับ 3.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ1.118 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าของเซลล์ของ *Agaricus* เพราะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะส่งผลต่อการตอบสนองของชีวเคมีเชิงเอนไซม์ โดยอุณหภูมิจะส่งผลต่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์เป็นหลัก รวมทั้งลักษณะทางกายภาพของการหมักของอาหารเหลวและ ทิศทางการสังเคราะห์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 25 องศาเซลเซียส น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพหรือปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่ออุณหภูมิเกิน 25 องศาเซลเซียสน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพหรือปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์จะมีแนวโน้มลดลง อาจเป็นเพราะว่าการเพิ่มอุณหภูมิเป็นการกระตุ้นให้เชื้อปล่อยเอนไซม์ทำให้เซลล์เจริญเติบโต และทำให้การทำงานของเมแทบอลิซึมลดลง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพมีค่าเท่ากับ 4.408 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.136 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ในส่วนของหัวเชื้อเริ่มต้น ถือเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการหมัก *Agaricus blazei* Murill ในสภาวะอาหารเหลว เพราะว่าหัวเชื้อเริ่มต้น จะต้องเริ่มต้นโดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารที่จะทำหัวเชื้อ เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเป็นจำนวนมาก แล้วนำมาใส่ในอาหารที่จะทำการหมักต่อไป เชื้อที่ใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงในกระบวนการหมักจะสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากขึ้น เนื่องจากสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้รวดเร็ว เมื่อทำการเติมหัวเชื้อร้อยละ 4 ไม่ว่าจะเป็นเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ หรือน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพจะมีค่าน้อยที่สุด อาจเป็นเพราะว่าใส่เชื้อที่มีเซลล์อยู่น้อยเกินไป เมื่อเติมหัวเชื้อที่ร้อยละ 8, 10 และ 12 จะมีปริมาณ เอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมหัวเชื้อร้อยละ 4 แต่ยังน้อยกว่า หัวเชื้อร้อยละ 6 มีความเป็นไปได้ว่าเมื่อเติมหัวเชื้อเกินร้อยละ 6 เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น และเพิ่มขึ้นรวดเร็ว โดยใช้สารอาหารและออกซิเจนหมดลง ซึ่งสารอาหารและออกซิเจนนั้นเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต เมื่อสิ้นสุดการทดลองความเหมาะสมของเชื้อที่เติมลงไป คือ ร้อยละ 6 ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ มีค่าเท่ากับ 6.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.114 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

Finley และ Fellers (1973) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นด้วยวิธีแอนโทรนที่ดัดแปลงขึ้นเพื่อประยุกต์ใช้ในการหาความหวานของน้ำนมถั่วเหลืองผสมข้าวสาลี Sweetened Wheat-Soy Blend (WSB) และน้ำนมถั่วเหลืองผสมข้าวโพด Corn-Soy-Milk (CSM) ทำการศึกษาโดยสกัดน้ำตาลด้วยเอทานอลร้อยละ 80 หลังจากนั้นกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีเฟลิ่ง การใช้สารละลายเฟลิ่งในการกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์จำเป็นต้องทำการระเหยเพื่อให้แห้งจากขั้นตอนในงานวิจัยของ Van Handel ที่ด่างเป็นตัวกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อทำการกำจัดน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ก็จะทำปฏิกิริยากับแอนโทรนที่อยู่ในกรดซัลฟิวริก (น้ำตาลซูโครส คือน้ำตาลที่ทำ

ปฏิกิริยากับน้ำยาแอนโทรนที่อุณหภูมิต่ำๆแล้วได้ผลบวก ไม่ใช่น้ำตาลที่ทำปฏิกิริยากับสารละลายเฟลิ่ง) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ในการทดลองดำเนินงานวิจัยโดยแบ่งการทดลองเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ใช้วิธีแอนโทรนกับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยมือ (Manual Methed) และวิธีที่ 2 ใช้วิธีแอนโทรนกับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ (Automated Method) จากการทดลองทำการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 13, 14, 14.5, 15, 17.5 ตามลำดับใน WSB และ CSM พบว่าน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ร้อยละ 17.5 และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นใน WSB มีค่าสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 17.58 และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นใน CSM มีค่าสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 17.64 ซึ่งค่าที่ได้มาจากการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ ส่วนการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นด้วยมือ พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นใน WSB และ CSM มีค่าสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 17.38 และ 17.50 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การใช้วิธีการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นด้วยเครื่องมืออัตโนมัติให้ผลที่ดีกว่าการตรวจวัดด้วยมือ และ CSM เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความหวานกว่า WSB เนื่องจากมีปริมาณของน้ำตาลซูโครสในผลิตภัณฑ์มากกว่า ในการใช้วิธีแอนโทรนกับการตรวจวัดด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างของ CSM ได้กว่า 300 ตัวอย่าง วิธีนี้จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ จากปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 15 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 50 ตัวอย่างในซ้ำต้องเท่ากับ 0.12 จึงจะสามารถใช้เพื่อการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้

สลิล (2557) ทำการศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแหนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ แหนเล็ก แหนใหญ่ และไข่น้ำ ทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในแหนด้วยวิธีแอนโทรนและวิธีฟีนอลซัลฟิวริก จากการทดลองพบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรนและฟีนอลซัลฟิวริกให้ผลที่แตกต่างกัน โดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริกจะให้ค่าที่สูงกว่า และมีค่าความคลาดเคลื่อนมากกว่า จึงทำให้การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรนมีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีฟีนอลซัลฟิวริก โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรนและวิธีฟีนอลซัลฟิวริกแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 อาทิ แหนใหญ่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ย 72.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งเมื่อวัดโดยวิธีแอนโทรน และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ย 110.83 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งเมื่อวัดโดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่วิเคราะห์ได้จากวิธีฟีนอลซัลฟิวริกมีปริมาณมากกว่าและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง ซึ่งอาจเกิดจากฟีนอลสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบชนิดอื่นที่สกัดได้จากแหนและมีผลรบกวนการวิเคราะห์ วิธีแอนโทรนจึงมีความจำเพาะต่อน้ำตาลสูงกว่าวิธีฟีนอลซัลฟิวริก

สุวิมล และคณะ (2557) ศึกษาการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติคและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร งานวิจัยนี้ได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากอาหารหมักดองจำนวน 97 เชื้อ และจากน้ำอ้อยจำนวน 28 เชื้อ โดยนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็งและเหลวที่แปรชนิดของน้ำตาลคือ ซูโครส

แลคโตส กลูโคส และฟรุคโตส พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถสร้าง EPS ได้สูงสุดในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน การสร้าง EPS นั้นสัมพันธ์กับการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อศึกษาหาสูตรและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่าเชื้อ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 ผลิต EPS ได้น้ำหนัก EPS ต่อกรัมซูโครสสูง เมื่อใช้อาหารที่ดัดแปลงสูตรโดยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสร้อยละ 4, 10, 8 และ 6 ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.5, 0.5, 0.25 และ 0.25 ตามลำดับ เปปโตนร้อยละ 1.5, 1.5, 1.0 และ 2.0 ตามลำดับ สารสกัดจากเนื้อสัตว์ร้อยละ 1.0, 1.5, 1.0 และ 1.0 ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เหมาะสมนี้ AP-1, AP-3, LE13-1 และ LE13-2 สามารถผลิต EPS ได้เท่ากับ 16.30, 18.56, 9.32 และ 6.35 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อ

เชื้อ *Agaricus* sp.

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิค

3.1.2.2 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

3.1.2.3 ฟีนอลร้อยละ 5

3.1.2.4 สารละลายแอนโทรน

3.1.2.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.1.2.6 กรดซัลฟิวริก

3.1.2.7 เอทานอลร้อยละ 98

3.1.2.8 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต

3.1.2.9 โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.1.2.10 แมกนีเซียมซัลเฟต

3.1.2.11 กลูโคส

3.1.2.12 เปปโตน

3.1.2.13 สารสกัดจากยีสต์

3.1.2.14 สีย้อม Lactophenol cotton blue

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.3.1 เครื่องบ่มเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.1.3.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน

3.1.3.4 เครื่องไมโครเวฟ

3.1.3.5 เครื่องผสมสาร

3.1.3.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3.7 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

3.1.3.8 เครื่องชั่งสาร

3.1.3.9 ตู้ถ่ายเชื้อ

3.1.3.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

3.1.3.11 ตู้ดูดควัน

3.1.3.12 ตู้อบลมร้อน

3.1.3.13 ไมโครเพลทรีดเดอร์ และ 96 wellplate

3.1.3.14 กล้องจุลทรรศน์

3.1.3.15 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ

3.1.3.16 ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.3.17 ตะแกรงวางเครื่องมือ

3.1.3.18 หลอดทดลอง

3.1.3.19 บีกเกอร์

3.1.3.20 จานเพาะเชื้อ

3.1.3.21 ช้อนตักสารเคมี

3.1.3.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.3.23 หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง.

3.1.3.24 กระบอกตวง

3.1.3.25 ลูบเขี่ยเชื้อ

3.1.3.26 ปิเปต

3.1.3.27 ขวดปรับปริมาตร

3.1.3.28 เครื่องดูดสารอัตโนมัติ

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เห็ดกระดุมบราซิล

3.2.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยใช้เทคนิค Slid culture (ดังภาคผนวกที่ ข) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ โดยสังเกตการณ์สร้างเส้นใย และสังเกตลักษณะโครงสร้างเส้นใยของเชื้อ โดยการย้อมสี Lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดาที่กำลังขยาย 10 เท่า และ 40 เท่า ตามลำดับ

3.2.1.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล โดยวิธี Molecular ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ดังภาคผนวกที่ ข) โดยส่ง

วิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์วิจัยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

3.2.2 การผลิตหัวเชื้อกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว

3.2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

หัวเชื้อ (stock culture) เห็ดกระดุมบราซิล เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นเอียง (slant) สูตร PDA (ดังภาคผนวกที่ 1ก) เพื่อทำการรักษาเชื้อก่อนนำไปเพาะเลี้ยงแบบสภาวะอาหารเหลว

3.2.2.2 การคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเหมาะสมเพื่อผลิตหัวเชื้อ

ทำการผลิตหัวเชื้อ โดยการแบ่งอาหารเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสูตร PDB ออกเป็น 4 สูตร ดัดแปลงจาก Carvajal และคณะ, 2011 ดังนี้ สูตรที่ 1 ไม่ใส่มันฝรั่ง สูตรที่ 2 ใส่มันฝรั่ง สูตรที่ 3ใส่มันฝรั่ง+กล้วยหอม และสูตรที่ 4 ไม่ใส่มันฝรั่ง+กล้วยหอม (ดังภาคผนวกที่ 2ก) เตรียมโดยการเติมเส้นใยที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผิวหน้าเอียงที่เตรียมขึ้นใหม่ (แผ่นวุ้นที่เป็นเส้นใยจำนวน 5 แผ่น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) เติมลงในอาหารสูตร PDB ดัดแปลง บรรจุอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 336 ชั่วโมง โดยอุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณมวลชีวภาพโดยวิธีการหาน้ำหนักแห้งที่ 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง เพื่อหากราฟการเจริญของหัวเชื้อ (growth curve) เพื่อทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสม

3.2.2.3 การผลิตหัวเชื้อเหลว

ทำการผลิตหัวเชื้อ เตรียมโดยการเติมเส้นใยที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผิวหน้าเอียงที่เตรียมขึ้นใหม่ (แผ่นวุ้นที่เป็น เส้นใยจำนวน 5 แผ่น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) เติมลงในอาหารสูตร PDB ดัดแปลง ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหาร (กรัมต่อลิตร) ดังต่อไปนี้: กลูโคส 20 เปปโตน 3 สารสกัดยีสต์ 3 กล้วยหอม 140 (ดังภาคผนวกที่ 2ก) โดยบรรจุอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 192 ชั่งโมง โดยอุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบการเขย่า 150 รอบต่อนาที

3.2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว

3.2.3.1 ทดสอบความเหมาะสมองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมในปริมาณแตกต่างกัน

ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ดัดแปลงจาก Carvajal และคณะ, 2011 มีองค์ประกอบของ กลูโคส เปปโตน สารสกัดยีสต์ และกล้วยหอม (ดังภาคผนวกที่ 3ก) โดยศึกษาปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร แล้วปรับพีเอชเป็น 6.5 - 7.5 ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ใส่หัวเชื้อเหลวของเห็ดกระดุมบราซิลร้อยละ 10 ในฟลาสก์ขนาด

250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่ 336 ชั่วโมง โดยฟลาสก์เขย่าตลอดเวลา อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส และใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (Cao และคณะ, 2014)

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อวัดปริมาณมวลชีวภาพที่ 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 ชั่วโมง โดยนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นน้ำหมักไว้ แล้วล้างส่วนเส้นใย 4-5 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทำการหาค่าน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพ และหาปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ โดยทำการตรวจสอบน้ำตาล คือ น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Dubois, 1956) น้ำตาลซูโครสโดยวิธีแอนโทรน(Dreywood, 1946) และโดยวิธีน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค(Miller, 1959)

ปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ น้ำตาลทั้งหมด ลบ น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลรีดิวส์ (Cao และคณะ, 2014) (ดังภาคผนวกที่ ข)

3.2.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial Experiment in Completely Randomized Design (CRD) ปัจจัยที่ศึกษาคือองค์ประกอบของอาหารและเวลา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวแปรที่ทำการศึกษาโดยวิธี Turkey multiple comparison test และมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab เวอร์ชั่น 16 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ดังภาคผนวกที่ ค)

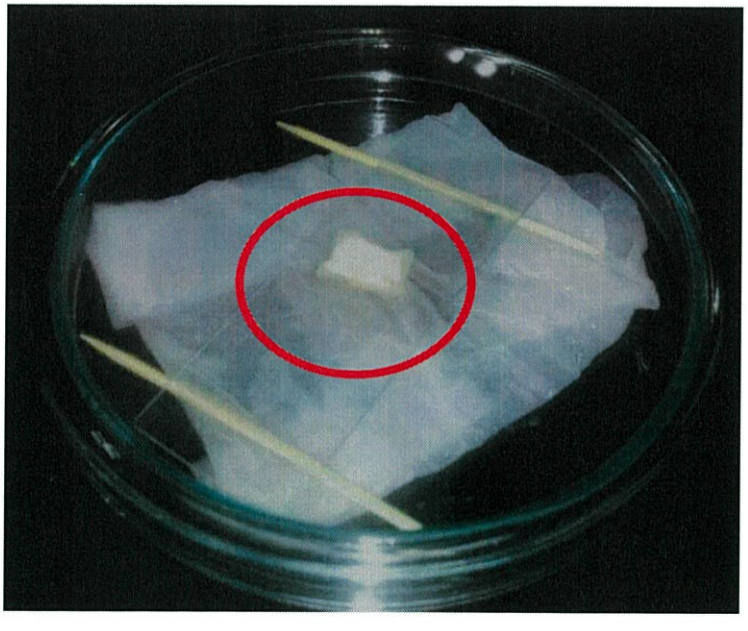
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการระบุชนิดของสายพันธุ์เห็ดกระดุมบราซิล

4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

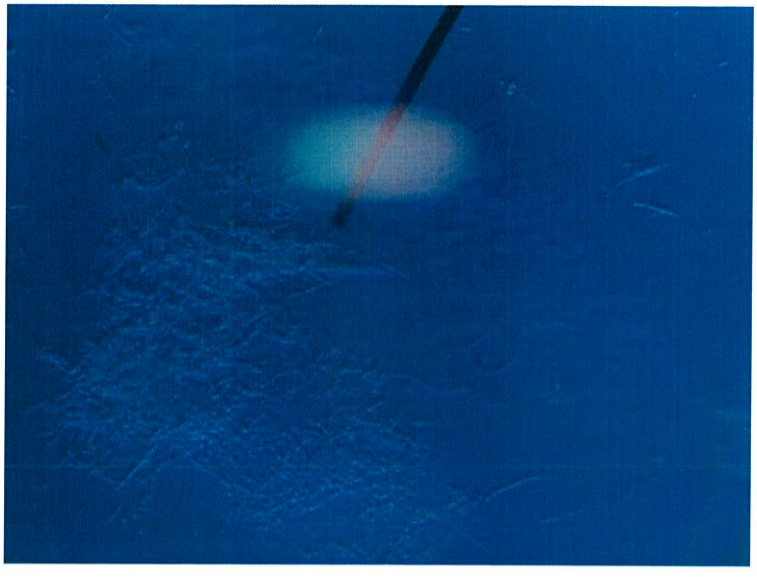
ลักษณะโดยรวมทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล เป็นราในชั้น Basidiomyces สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โคโลนีจะเห็นเป็นกลุ่มของเส้นใย (Mycelium) มีลักษณะปุยสีขาว คล้ายสำลี เส้นใย (hypha) ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือสปอร์ซึ่งเจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง เรียกว่า reproductive hypha โดยมีการชูส่วนของเส้นใยและสปอร์ขึ้นบนผิวหน้าอาหารแข็ง เมื่อทำการย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นหลังสว่างที่กำลังขยายภาพ 400 เท่า พบว่าเส้นใยของเชื้อเห็ดกระดุมมีลักษณะยาว มีผนังกั้น และมีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ซึ่งมีลักษณะเรียบ

4.1.1.1 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิลเมื่อมองด้วยตาเปล่า

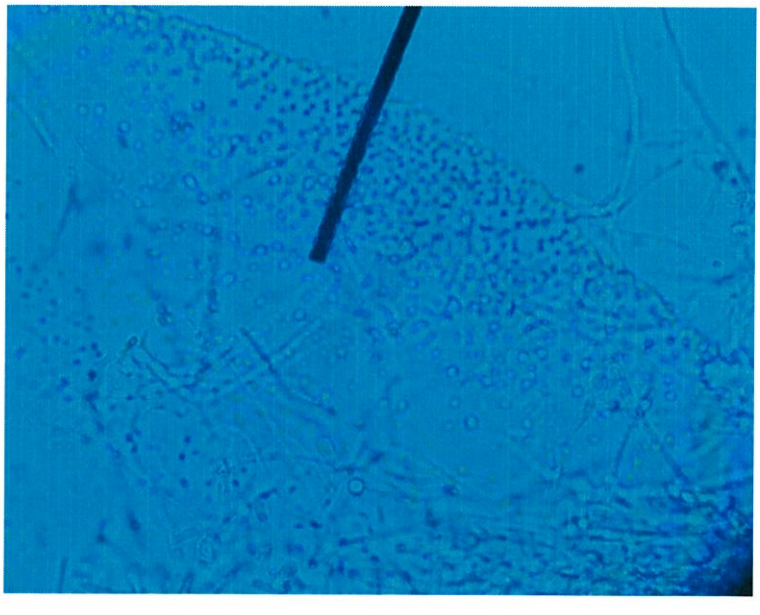


รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่เจริญบนผิวหน้าอาหารแข็ง เส้นใยเจริญปกคลุมบนอาหารแข็ง ลักษณะเป็นปุยสีขาว คล้ายสำลี มีการชูส่วนของเส้นใยขึ้นบนผิวหน้าอาหาร

4.1.1.2 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 4.2 ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 100 เท่า มองเห็นเส้นใยเป็นกระจุกรวมตัวกันอยู่ และเห็นส่วนของสปอร์ขนาดเล็ก



รูปที่ 4.3 ลักษณะเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลที่ย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายภาพ 400 เท่า มองเห็นเส้นใยชัดเจนขึ้น เส้นใยมีลักษณะยาว มีผนังกั้น มีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ลักษณะเรียบ

4.1.2 การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม

ทำการจำแนกเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลโดย Molecular Method ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการจำแนกเชื้อ คือ *Agaricus* sp . โดยเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ Internal Transcribed Spacer (ITS) จากฐานข้อมูลสากล GenBank มีความเหมือนร้อยละ 100 สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ITS จากคู่ไพร์เมอร์ ITS5/ITS4 630 นิวคลีโอไทด์ (ดังภาคผนวกที่ ข)

4.2 ผลการศึกษาการผลิตหัวเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว

4.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงและเวลาที่แตกต่าง โดยคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อทำการผลิตเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล

จากการศึกษาองค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 4 สูตร และเวลาที่ใช้แตกต่างกัน โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยง คือ ความเร็วรอบของการเขย่า อุณหภูมิ ปริมาณเชื้อที่เติมลงในอาหาร พบว่าอาหารสูตรที่ 4 ให้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุด คือ 2.90±2.34 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 336 ชั่วโมง รองลงมา คือ 2.72±0.23 ที่เวลา 48 ชั่วโมง อาหารสูตรที่ 4 ให้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเป็นเพราะองค์ประกอบของสารอาหารมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว (Dulay และคณะ, 2015) ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 4 มีลักษณะจำเพาะที่ถูกดัดแปลงจาก Carvajal และคณะ, 2011 โดยการเติมกล้วยหอมลงไปเพื่อใช้เป็นทั้งแหล่งโพแทสเซียมและแมกนีเซียม และยังอุดมไปด้วยสารอาหาร ซึ่งปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงสุดที่อาหารสูตรที่ 4 ชั่วโมงที่ 336 มีค่าเท่ากับ 2.90±2.34 แต่ในทางสถิติปริมาณดังกล่าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารสูตรที่ 4 ที่ชั่วโมงที่ 288, 240 และ 192 และสูตรที่ 2 ที่ชั่วโมง 336 และ 288 แสดงดังตารางที่ 4.1 ดังนั้นจึงพิจารณาอาหารสูตรที่ 4 ชั่วโมงที่ 192 เพราะองค์ประกอบของสูตรอาหารเป็นแบบอินทรีย์และอุดมไปด้วยสารที่เหมาะสมแก่การเจริญของเห็ดกระดุมบราซิล และช่วงชั่วโมงที่ 192 เชื้อมีการเจริญดี (log phase) อีกทั้งลดระยะเวลาการผลิตหัวเชื้อเมื่อทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.3 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว

4.3.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมและเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเห็ดกระดุมบราซิล

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอม พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไปปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 336 ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงสุด คือ 7.72 ± 0.70 กรัมต่อลิตร แต่ในทางสถิติปริมาณดังกล่าวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกล้วยหอม

ปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 288 และ 240 และกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 336, 288 และ 240 และกล้วยหอมปริมาณที่ 100 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 336 แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเมื่อทำการผลิตหัวเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)			
	สูตรอาหารเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ			
	1	2	3	4
48	0.01 ± 0.00^{d}	0.14 ± 0.09^{cd}	0.15 ± 0.06^{cd}	0.51 ± 0.11^{cd}
96	0.06 ± 0.03^{cd}	0.17 ± 0.04^{cd}	0.30 ± 0.23^{cd}	0.76 ± 0.41^{cd}
144	0.09 ± 0.05^{cd}	0.21 ± 0.10^{cd}	0.39 ± 0.18^{cd}	1.00 ± 0.12^{bcd}
192	0.19 ± 0.05^{cd}	0.52 ± 0.14^{cd}	0.52 ± 0.23^{cd}	1.80 ± 0.72^{abc}
240	0.31 ± 0.06^{cd}	1.02 ± 0.06^{bcd}	0.84 ± 0.57^{cd}	2.68 ± 0.13^{ab}
288	1.00 ± 0.81^{bcd}	1.18 ± 0.35^{abcd}	0.93 ± 0.53^{cd}	2.72 ± 0.23^{ab}
336	1.05 ± 0.60^{bcd}	1.21 ± 0.08^{abcd}	0.92 ± 0.41^{cd}	2.90 ± 2.34^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3.2 ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมและเวลาที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมแตกต่างกัน พบว่าปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 38.88±1.03 กรัมต่อลิตร โดยเติมกล้วยหอมลงในสูตรอาหารปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 336 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ที่รองลงมาคือ 33.01±0.44 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมกล้วยหอมลงในสูตรอาหารปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 336 แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิล โดยเติมกล้วยหอมลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง

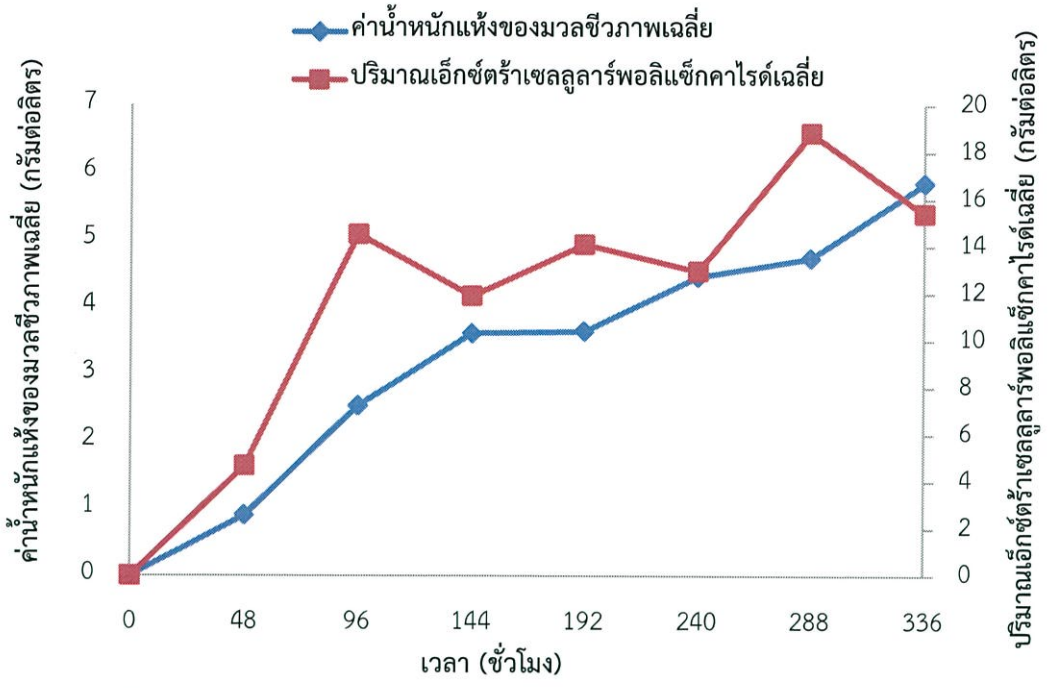
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร) ปริมาณกล้วยหอม (กรัมต่อลิตร)		
	100	140	180
48	0.90 ± 0.12^{ghi}	0.66 ± 0.46^{hi}	0.37 ± 0.12^{i}
96	2.53 ± 1.19^{efghi}	2.96 ± 0.91^{efgh}	2.01 ± 0.15^{fghi}
144	3.61 ± 0.59^{def}	3.25 ± 0.84^{ef}	3.16 ± 0.31^{efg}
192	3.64 ± 0.76^{def}	4.36 ± 0.23^{cde}	4.20 ± 0.47^{cdef}
240	4.45 ± 0.31^{cde}	5.99 ± 1.03^{abc}	5.84 ± 0.97^{abcd}
288	4.73 ± 0.83^{bcde}	6.89 ± 0.10^{ab}	7.37 ± 0.78^{a}
336	5.84 ± 0.93^{abcd}	7.35 ± 1.54^{a}	7.72 ± 0.70^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95

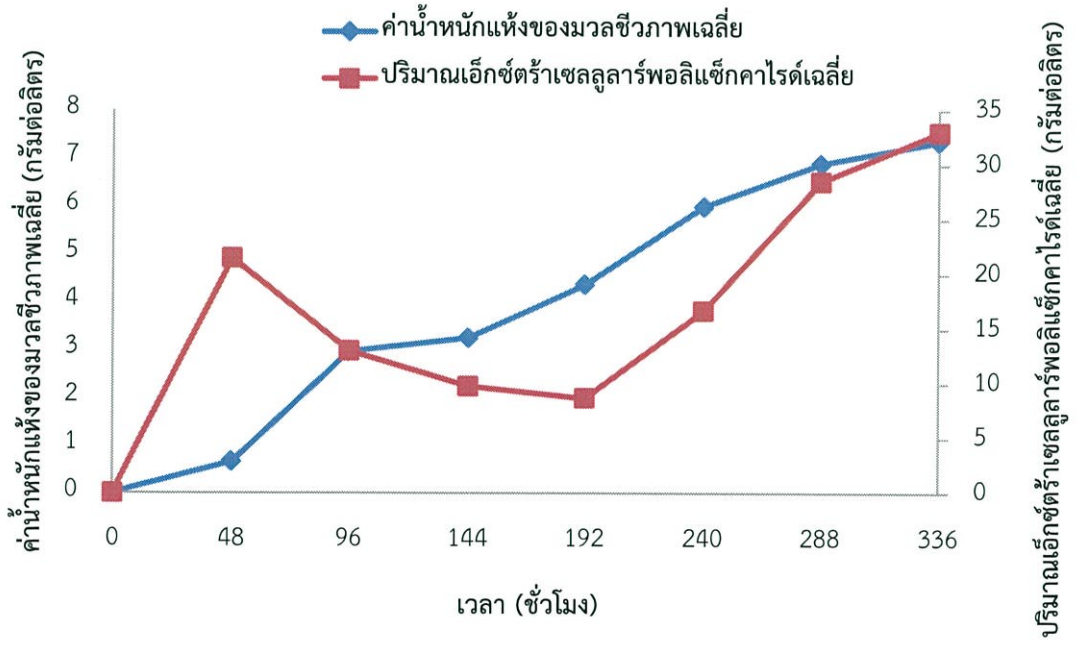
ตารางที่4.3 ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลที่มีการเติมกล้วยหอมปริมาณ 100 , 140, และ 180 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบของอาหารที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) ปริมาณกล้วยหอม (กรัมต่อลิตร)		
	100	140	180
48	4.68 ± 0.74^{m}	21.47 ± 0.37^{de}	8.58 ± 1.54^{l}
96	14.52 ± 0.51^{ghi}	13.02 ± 0.74^{hij}	4.38 ± 0.75^{m}
144	11.89 ± 0.20^{ijk}	9.79 ± 2.32^{kl}	11.39 ± 1.12^{jk}
192	14.10 ± 0.43^{ghi}	8.69 ± 0.24^{l}	26.25 ± 0.50^{c}
240	12.96 ± 0.57^{hij}	16.67 ± 0.31^{fg}	15.33 ± 0.45^{gh}
288	18.83 ± 0.96^{ef}	28.50 ± 0.71^{c}	22.22 ± 0.51^{d}
336	15.40 ± 0.63^{gh}	33.01 ± 0.44^{b}	38.88 ± 1.03^{a}

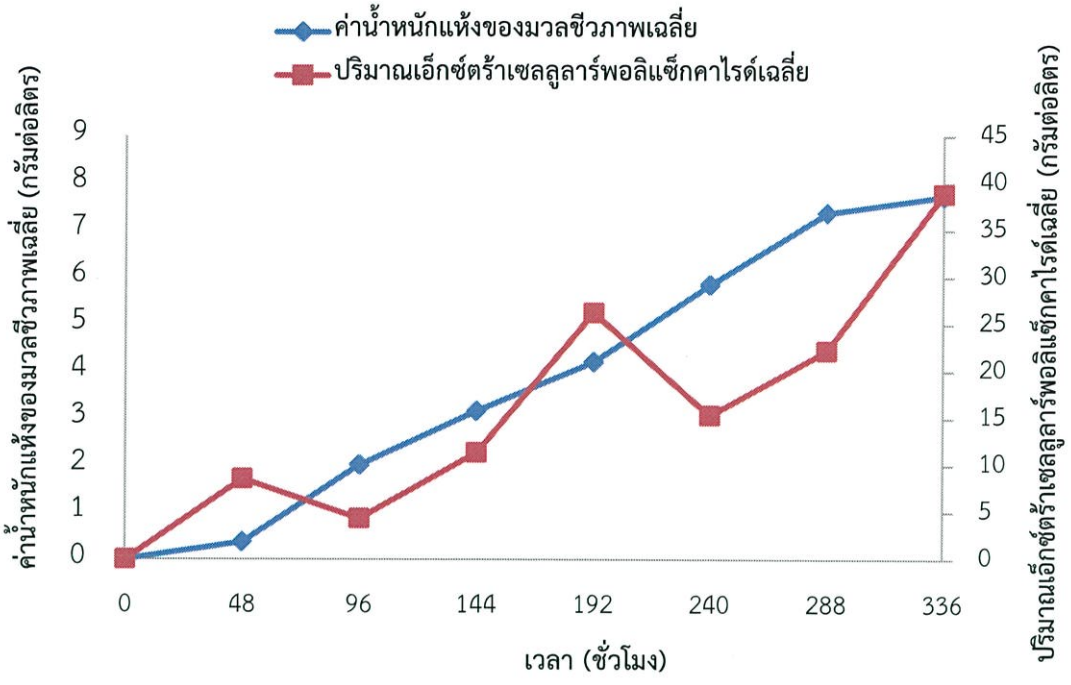
หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.5 ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ



รูปที่ 4.6 ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพเฉลี่ย และปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของอาหารดัดแปลงสูตรที่มีองค์ประกอบของกล้วยหอมปริมาณ 180 กรัมต่อลิตรที่เวลาต่างๆ

หลักการเลือกอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลมีส่วนสำคัญอย่างมากเพราะอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลควรมีองค์ประกอบพื้นฐานของอาหารบางส่วนที่ใช้สำหรับการผลิตมวลชีวภาพและพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเพาะเลี้ยงควรใช้อาหารสูตรเดียวกับที่จะใช้ชักนำก่อนช่วงระยะเวลาหนึ่ง(หัวเชื้อ) เพราะจะได้มีการเจริญและสร้างเส้นใยขึ้นมาอีกครั้งจากอาหารเหลว (Carvajal และคณะ, 2011) จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงประยุกต์โดยการเติมกล้วยหอมลงในสูตรอาหาร ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเห็ดกระดุมบราซิลและปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงไปในทิศทางเดียวกันคือ ถ้าเติมกล้วยหอมปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร จะมีการเจริญและให้ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด ที่ชั่วโมง 336 แสดงว่าปริมาณมวลชีวภาพและปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของเห็ดกระดุมบราซิลแปรผันตรงกับปริมาณสารอาหาร สอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่าสารอาหารมีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว ยิ่งกว่านั้นคืออาหารที่มีลักษณะจำเพาะของสารอาหารที่ประกอบอยู่ และพีเอช ยังเป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญของเห็ด โดยค่าผลได้ของมวลชีวภาพจะแตกต่างกัน ตามแหล่งคาร์บอน (Dulay และคณะ, 2015) ซึ่งในการทดลองได้ใช้ น้ำตาลกลูโคส และเพิ่มแหล่งโพแทสเซียมและแมกนีเซียม คือ กล้วยหอม ซึ่งกล้วยหอมอุดมไปด้วยแร่ธาตุสารอาหารต่างๆ (เบญจมาศ, 2545) นอกจากนั้นอุณหภูมิ และความเร็วรอบการเขย่าที่มีความสำคัญต่อเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ และเส้นใยของ *Agaricus blazei Murill* โดยอาจจะมีผลต่อ

เชื้อระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง ซึ่งอุณหภูมิจะมีส่วนในเรื่องการกระตุ้นเอนไซม์ภายในเซลล์ และความเร็วของการเขย่าเพื่อเพิ่มออกซิเจนในกระบวนการหมัก โดยในการทดลองได้ควบคุมให้ทั้ง 2 ปัจจัยนี้คงที่

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาผลขององค์ประกอบของสูตรอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้ากลูแคนจากเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus brasiliensis*) ด้วยวิธีการหมักในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ปัจจัยที่ศึกษาคือ องค์ประกอบและเวลา โดยเริ่มต้นที่การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตหัวเชื้อเหลว พบว่า สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้ กลูโคส 20 เปปโตน 3 สารสกัดจากยีสต์ 3 และกล้วยหอม 140 และโดยทำการเลี้ยงที่ 192 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีและมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปผลิตหัวเชื้อ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลว ซึ่งสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเลือกใช้สูตรเดียวกับการผลิตหัวเชื้อ แต่จะแตกต่างที่ปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในสูตรอาหาร โดยกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 240 ชั่วโมง ให้ค่าน้ำหนักแห้งมวลชีวภาพเหมาะสมที่สุด คือ 5.99±1.03 และปริมาณกล้วยหอม 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 336 ชั่วโมง ให้ค่าปริมาณเอ็กตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 38.88±1.03 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดกระดุมบราซิลในสภาวะอาหารเหลวเพื่อหาปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ โดยใช้อาหารเหลวดัดแปลงสูตรที่มีกล้วยหอมเป็นองค์ประกอบปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงและสุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง พบว่าอาหารเหลวที่มีกล้วยหอมปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 336 ชั่วโมง และอาหารเหลวที่มีกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 240, 288 และ 336 ชั่วโมง รวมทั้งอาหารเหลวสูตรที่มีกล้วยหอมปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 240, 288 และ 336 ชั่วโมง ให้ค่าปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงสุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสามารถเลือกใช้อาหารเหลวดัดแปลงได้ทั้ง 3 สูตร แต่ในทางเศรษฐกิจต้องคำนึงถึงต้นทุนและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นหลัก จึงควรเลือกใช้อาหารเหลวที่มีกล้วยหอมปริมาณ 140 กรัมต่อลิตรที่เวลา 240 ชั่วโมง เนื่องจากใช้ เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นที่ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพไม่แตกต่างกัน เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงลงได้

นอกจากนี้ผลงานวิจัยยังพบว่าอาหารเหลวดัดแปลงสูตรที่มีกล้วยหอมเป็นองค์ประกอบมีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิล ทำให้เส้นใยเจริญได้ดี มีผลให้ปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้น และส่งผลให้สามารถผลิตเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณที่สูงขึ้น เนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปในสูตรอาหาร มีทั้งน้ำตาลกลูโคสที่เติมเข้าไป รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่อยู่ในกล้วยหอม ทำให้เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้เต็มที่กว่าเมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตรปกติที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงควรศึกษาแหล่งคาร์บอนในองค์ประกอบของสูตรอาหารเพิ่ม เพื่อให้เห็ดกระดุมบราซิลสามารถเจริญและผลิตเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์อย่างเบต้ากลูแคนได้ในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเน้นแหล่ง

คาร์บอนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นอินทรีย์วัตถุที่ให้คุณค่าและปลอดภัย ไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ ทั้งนี้ยังคงต้องควบคุมปัจจัยอื่น เช่น พีเอชของอาหาร อุณหภูมิ และความเร็วรอบการเขย่าให้คงที่ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญของเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้อาจทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถเจริญได้ดีและผลิตสารสำคัญในปริมาณสูงขึ้น พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งมีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์อย่างเบต้ากลูแคนได้ในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเน้นแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นอินทรีย์วัตถุที่ให้คุณค่าและปลอดภัย ไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ ทั้งนี้ยังคงต้องควบคุมปัจจัยอื่น เช่น พีเอชของอาหาร อุณหภูมิ และความเร็วรอบการเขย่าให้คงที่ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญต่อการเจริญของเส้นใยของเห็ดกระดุมบราซิลในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้อาจทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถเจริญได้ดีและผลิตสารสำคัญในปริมาณสูงขึ้นได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณัฐวุฒิ บุญยืน. 2556. ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้เป็นสากล. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.vcharkarn.com/blog/116428. (22 มิถุนายน 2559).

ดอเล๊าะ ดาลี. 2542. ชีววิทยาจุลินทรีย์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. ยะลา.

นิรนาม. 2555. โครงสร้างอย่างง่ายของเบต้ากลูแคน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: https://www.beta1-3dglucan.com. (4 เมษายน 2559).

นิรนาม. ม.ป.ป. องค์ประกอบของกล้วย. กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.lovefitt.com/calories-monitor. (10 พฤษภาคม 2559).

เบญจมาศ ศิลาย้อย. 2545. กล้วย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปิยธิดา จันทรมานันท์. 2557. อิทธิพลของสารสกัดเบตา-กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าต่อชนิดเซลล์แมคโครฟาจ ชนิด RAW264.7 และเซลล์กล้ามเนื้อ L6. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พีรศักดิ์ วรสุนทโรสถ. 2544. ทรัพยากรพืชในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 2: ไม้ผล และไม้ผลเคี้ยวมัน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ

มนัส ไพฑูรย์เจริญลาภ. 2553. การวางแผนการทดลองทางชีววิทยา. สาขาวิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ.
วิทยา กดุมภะ. 2555. เบต้ากลูแคน. สำนักพิมพ์เพชรประกาย. กรุงเทพฯ.

ศศิวิมล แสวงผล, จามร สมณะ และสมรรถชัย ฉัตราคม. 2552. 108 พันธุ์กล้วยไทย. มูลนิธิสวนสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรุงเทพฯ.

สลิล ชัยโรจน์. 2557. การพัฒนาแหนเพื่อเป็นพืชน้ำต้นแบบในการวิจัยพื้นฐานและการนำไปประยุกต์ใช้ทาง เทคโนโลยีชีวภาพ. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2557. 72 หน้า.

สุวิมล กีรติพิบูล, สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และฐิตาภา เขียวขจี. 2557. การผลิตเอ็กซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเชื้อ แบคทีเรียแลคติคและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2548. เห็ดกระดุมบราซิลเป็นอาหารสร้างภูมิคุ้มต้านป้องกันและยับยั้งมะเร็ง. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.anonbiotec.com/Button_mushroom_cancer. (27 กันยายน 2558).

อารี ฤทธิบูรณ์. 2555. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 5. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

Anonymous. 1999. agarose gel electrophoresis. [Online]. Available Source: https://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/genetics/pcr.html. (June 22, 2016).

Anonymous. 1999. Gene that codes for ribosomal DNA. [Online]. Available Source: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/cell.html. (June 22, 2016).

Anonymous. 1999. PCR (The polymerase chain reaction). [Online]. Available Source: http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html. (June 22, 2016).

Alberts, Bruce et al. 1983. Molecular Biology of the cell. New York: Garland. Beldecos, A. et al.1988. The Importance of Feminist Critique for Contemporary Biology. Hypatia, 3: 61-76.

Cao, X., Zhao, Y., Xiong, Li., Ren, L. and Liu, .Jia. 2014. Research of Submerge Fermentation Conditions on *Agaricus blazei* Murill. Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, China.

Carvajal, A.E.S.S., Koehnlein, E.A., Soares, A.A., Eler, G.J., Bracht, A.T.A.N.A. and Peralta, R.M. 2011. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis (A. blazei)* and their antioxidant properties. Biochemistry, Universidade Estadual de Maringá, Brazil.

Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18: 499.

Dubois, M., Giles, K.A. and Hamilton, J.K. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28 (3): 350-356. ISSN 0003-2700.

Dulay, R.M.R., Ray, K. and Hou, C.T. 2015. Optimization of liquid culture conditions of Philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids. Nueva Ecija, Philippine.

Finley, J.W. and Fellers, D.A. 1973. Sucrose Determination by a Modified Anthrone Method Application with Sweetened Wheat-Soy Blend and Corn-Soy-Milk. Western Regional Research Laboratory 6: 210-215.

Firenzuoli, F., Gori, L. and Lombardo, G. 2007. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems, Center of Natural Medicine and Department of Internal Medicine, Giuseppe, S. Hospital, Empoli, Italy.

Freifelder, D. 1985. Essentials of Molecular Biology. Jones and Bartlett, Boston.

Leung, M.Y., Liu, C., Koon, J.C. and Fung, K.P. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. Immunology Letters 105 (2): 101-114.

Malinow, M.R. 1996. Cholesterol sequestrant glycosides that inhibit intestinal cholesterol absorption. U.S. patent number 08,080,282.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-429.

Mizuno, T. 1996. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Food and Food Ingredients Journal of Japan 167: 69-85.

Papus, M.A. 1998. Antioxidants Status, Diet, Nutrition and Health. CRC Press. U.S.A.

Pramanik, M., Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D. and Islam, S.S. 2005. Structural investigation of a polysaccharides (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. Carbohydrate Research 340 (4): 629-636.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109(16): 6241-6246.

Summer, J.B. and Sisler, E.B. 1944. A simple method for blood sugar. Archives of Biochemistry and Biophysics 4: 333-336. ISSN 0003-9861.

Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kováříková, E. and čopíková, J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymers 76 (4): 548-556.

Trelyan, W.E. and Harrison, J.S. 1952. Biochemical Journal 50: 298.

Volman, J.J., Helsper, J.P., Wei, S., Baars, J.J., van Griensven, L..J., Sonnenberg, A.S., Mensink, R.P. and Plat, J. 2010. Effect of mushroom-derived β–glucan-rich polysaccharide extract on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-KB transactivation in Caco-2 reporter cell: Can effect be explained by structure?. Molecular Nutrition and Food Research 54 (2): 268-276.

Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a soure of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 60 (3): 258-274.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก 1ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA) เตรียม 1000 มิลลิลิตร

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม

ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 20 นาที ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส และวุ้น นำเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก 2ก การเตรียมอาหารเลี้ยงหัวเชื้อสูตร Potato dextrose broth (PDB) ดัดแปลงจาก Carvajal และคณะ, 2011 เตรียม 1000 มิลลิลิตร

สูตรที่ 1 (ไม่ใส่มันฝรั่ง)

กลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม

ละลายกลูโคส เปปโตน สารสกัดยีสต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต ในน้ำกลั่นคนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 2 (ใส่มันฝรั่ง)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม

ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 20 นาที ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมละลายกลูโคส เปปโตน สารสกัดยีสต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 3 (ใส่มันฝรั่ง+กล้วยหอม)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
กล้วยหอม	140	กรัม

ต้มกล้วยหอมและมันฝรั่งเป็นเวลา 20 นาที ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมละลายกลูโคส เปปโตน และสารสกัดยีสต์ คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 4 (ไม่ใส่มันฝรั่ง + กล้วยหอม)

กลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
กล้วยหอม	140	กรัม

ต้มกล้วยหอมเป็นเวลา 20 นาที ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมละลายกลูโคส เปปโตน และสารสกัดยีสต์ คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก 3ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose broth (PDB) ดัดแปลงจาก Carvajal และคณะ, 2011 เตรียม 1000 มิลลิลิตร

กลูโคส	20	กรัม
เปปโตน	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
กล้วยหอม	100, 140, 180	กรัม

ต้มกล้วยหอม(ตามปริมาณที่ใช้ทดสอบ) เป็นเวลา 20 นาที ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมละลายกลูโคส เปปโตน และสารสกัดยีสต์ คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารและการวิเคราะห์

1. เทคนิค Slide culture แบบตัดชิ้นวุ้น (ดอเล๊าะ, 2542)

1.1 การเตรียมจานเพาะเชื้อ ใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร นำกระดาษทิชชูวางไว้ในจานเพาะเชื้อ นำไม้จิ้มฟันวางลงแล้วนำสไลด์ที่สะอาดวางบนไม้จิ้มฟันแล้วนำไปอบเพื่อฆ่าเชื้อหรือทำให้ปราศจากเชื้อ

1.2 การเตรียมวุ้น วุ้นที่เตรียมคือ potato dextrose agar เทบนจานเพาะเชื้อซึ่งเทหนากว่าปกติ แล้วตัดวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 1 เซนติเมตร หลายๆชิ้น

1.3 การนำเชื้อราลงเพาะ นำวุ้นที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส วางลงบนสไลด์ที่ปลายด้านหนึ่งนำเชื้อที่ต้องการตรวจมาวางลงบนแผ่นวุ้นแล้ว เกลี่ยให้ทั่วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเทลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 11.5 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิดความชื้น แล้วนำไปเก็บในที่มิดชิดคอยสังเกตจนเชื้อราเจริญงอกงามเกือบถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ (ประมาณ 2 สัปดาห์)

1.4 การถอด Slide culture ถอดกระจกปิดสไลด์ออกแล้วล้างด้านบนด้วยแอลกอฮอล์ จับด้านล่างที่ติดกับวุ้นหงายขึ้นแล้วหยดแอลกอฮอล์ 1 หยด ทิ้งไว้จนแห้ง หลังจากนั้นเตรียมสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง หยด lactophenal cotton blue 1 หยด ที่ปลายด้านหนึ่งของสไลด์ แล้วนำกระจกปิดสไลด์ที่ปิดบนวุ้นแตะบน lactophenal cotton blue ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ส่วนสไลด์ที่มีวุ้นวางอยู่ให้เขี่ยวุ้นทิ้งไป ล้างสไลด์ด้านหลังด้วยแอลกอฮอล์ส่วนด้านบนที่ติดกับวุ้นหยดแอลกอฮอล์ลงไป 1 หยด ทิ้งไว้จนแห้งแล้วนำ lactophenal cotton blue มาหยดลงบริเวณที่เคยวางวุ้น นำกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อมาปิด ผึ่งสไลด์ที่อุณหภูมิห้องจน lactophenal cotton blue หมาดลง ทาขอบทั้งสี่ของกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

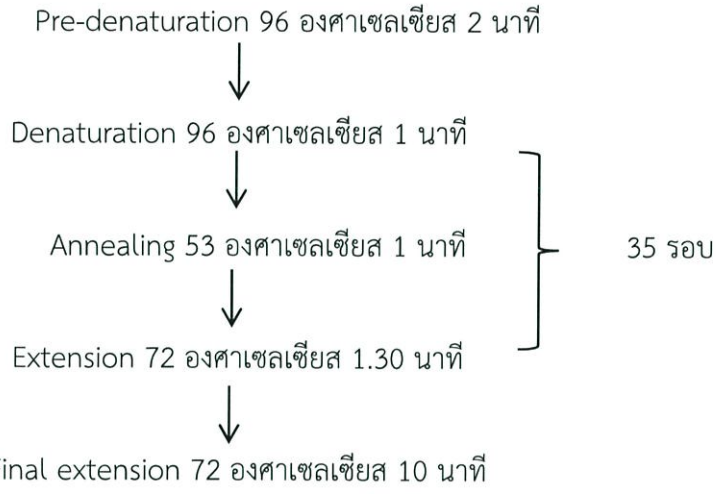
2. การทดสอบลักษณะทางพันธุกรรม โดยวิธีการ Molecular

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดกระดุมบราซิล โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป E.Z.N.A. Isolation Kit (Omega Bio-Tek) ตามคู่มือการใช้งาน

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ 1 เท่าบัฟเฟอร์เพื่อทำปฏิกิริยากับ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MaCl_2$) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมล และเอนไซม์ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต รวมปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มจาก



รูปภาคผนวกที่ 1ข ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่

2.3 การแยกทางไฟฟ้าโดยเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส และการวิเคราะห์ลำดับเบส

เมื่อได้ดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปฏิกิริยาลูกโซ่แล้วนำไปตรวจสอบได้โดยใช้ ร้อยละ 1 วุ้นอะกาโรสเจคอิเล็คโทรโฟรีซีส สีย้อมเอธิเดียมโบรไมด์ และเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณจะนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสตามคำสั่งอัตโนมัติ (ของบริษัท Macrogen ที่ประเทศเกาหลี) ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Lnternal Transcribed Spacer (ITS) ของเห็ดกระดุมบราซิล จากคู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบส 5'-TTTAGAGCATGTGCACGCCTGTTTGGACTTC
ATTTTCATCCACCTGTGCACCTATTGTTCTTTGGTTGGGTTAGGAGGAAGTGTCATTGTGTCAG
CATCTGCTGGATGTGGAGGATTTGCATTGTGAAAGCTTTGCTGTCCTTGATGGATCATGGAATC
TCTTTCTCACTAGAGTCTATGTCACTCATTATACTCTGTCGAATGTCATTGAATGTCTTTACATG
GGCTTGTATGCCTATGAAAATTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCT
CAACTCTCTTATACTTTTTTGTAAAAGAGAGCTTGGACTGTGGAGGCTTGCTGGCCACTTTTTG
GGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAAGTTA

TCTACGCTGGCGAGGGGATTGCTCTCTGTAATGTTCAGCTTCTAATTGTTCTCTACTTTGTGAGA CTACTTTGAATGCTGACCT-3' 630 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าเชื้อเห็ดกระดุมบราซิลมีความเหมือนกับหลายสปีชีส์ร้อยละ 99 ดังนี้

1. *Agaricus blazei* strain D ที่ 5.8S ribosomal RNA gene

2. *Agaricus* subrufescens strain WC837-S04 ที่ 18S ribosomal RNA gene, 8S ribosomal RNA gene and 28S ribosomal RNA gene

3. *Agaricus blazei* strain WC837 ที่ 5.8S ribosomal RNA gene and large subunit ribosomal RNA gene

4. *Agaricus brasiliensis* ที่ ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain 631

5. *Agaricus blazei* ที่ 5.8S ribosomal RNA gene

6. *Agaricus blazei* ที่ 5.8S rRNA gene and isolate CDF-Bfc80622

7. *Agaricus blazei* strain B ที่ 5.8S ribosomal RNA gene

8. *Agaricus* campestris voucher NVE 470 ที่ 18S ribosomal RNA gene, 5.8S ribosomal RNA gene and 28S ribosomal RNA gene

9. *Agaricus* rufotegulis ที่ 18s ribosomal RNA, 5.8S ribosomal RNA gene and 28S ribosomal RNA gene

10. *Agaricus brasiliensis* ที่ ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher HAI herbarim 0978-1

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีไดไนโตรซาลิไซลิค (Miller, 1959)

3.1 สารเคมี

1. การเตรียมสารละลายกรด 3-5 ไดไนโตรซาลิไซลิค (1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (potassium sodium tartate) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัมปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : อาจเติมโซเดียมซัลไฟต์อีกร้อยละ 0.05 ก่อนนำสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิคไปใช้

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 1ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	10	0
2	1	9	0.1
3	2	8	0.2
4	3	7	0.3
5	4	6	0.4
6	5	5	0.5

3.2 วิธีการทดลอง

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว) หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (เข้มข้น 0-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิคปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร

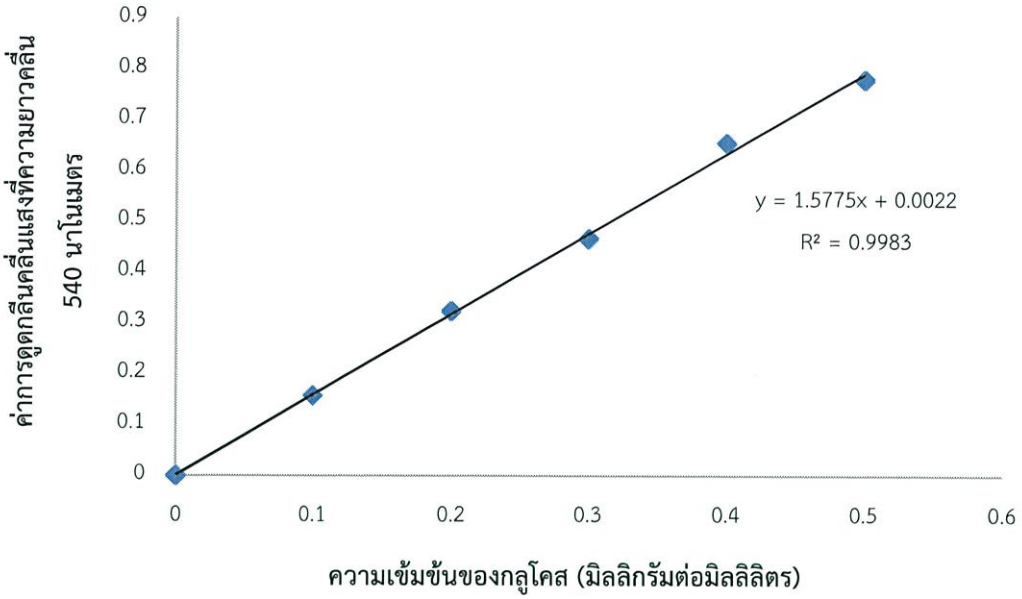
3. นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

4. แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

5. เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ 2ข) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



รูปภาคผนวกที่ 2ข กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

4.1 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)

2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 2ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	10	0
2	2	8	20
3	4	6	40
4	6	4	60
5	8	2	80

4.2 วิธีการทดลอง

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร

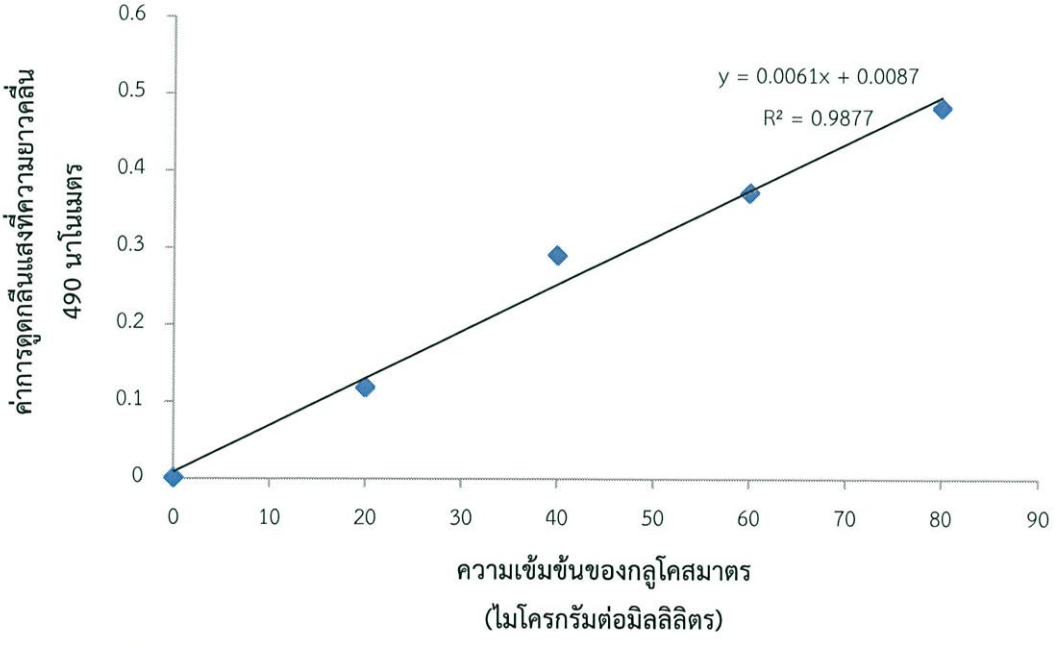
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยๆปล่อยลงที่ข้างหลอด

3. ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วนำมาบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยถ้าเป็นน้ำตาลเฮกโซสวัดที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ส่วนน้ำตาลเพนโตสและกรดยูโรนิกนั้นวัดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ 3ข) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน) x (1000)}}$$



รูปภาคผนวกที่ 3ข กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์โดยวิธีแอนโทรน (Dreywood, 1946)

5.1 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 : เตรียมโดยใส่น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่แท่งเหล็กวางในอ่างน้ำบนแท่นกวน (ทำในตู้ดูดควัน) ตวงกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ร้อยละ 95-97) ปริมาตร 390 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปรับปริมาตรที่มีน้ำกลั่นอย่างช้าๆ และระมัดระวัง ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายแอนโทรน : ชั่งสารแอนโทรน 0.5 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติม absolute ethanol 5 มิลลิลิตร คนให้พอดีละลายแล้วเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 จากนั้นกลั้วบีกเกอร์ด้วย absolute ethanol 5 มิลลิลิตร เทลงในขวดปรับปริมาตรอีกครั้ง และปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 ใส่แท่งเหล็ก ปิดฝา แล้วห่อขวดด้วยฟลอยด์ (ห้ามโดนแสง) จากนั้นนำไปตั้งบนแท่นกวน เพื่อให้สารแอนโทรนละลายจนหมด

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางภาคผนวกที่ 3ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	10	0
2	2	8	20
3	4	6	40
4	6	4	60
5	8	2	80
6	10	0	100

5.2 วิธีการทดลอง

1. เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน / สารละลายยพอลิเมอร์ / น้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง

2. นำหลอดไปแช่น้ำในอ่างน้ำแข็ง รอจนสารละลายเย็นลง

3. เติมสารละลายแอนโทรน ที่แช่เย็นไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน (ขณะเติมและเขย่าต้องให้หลอดอยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา)

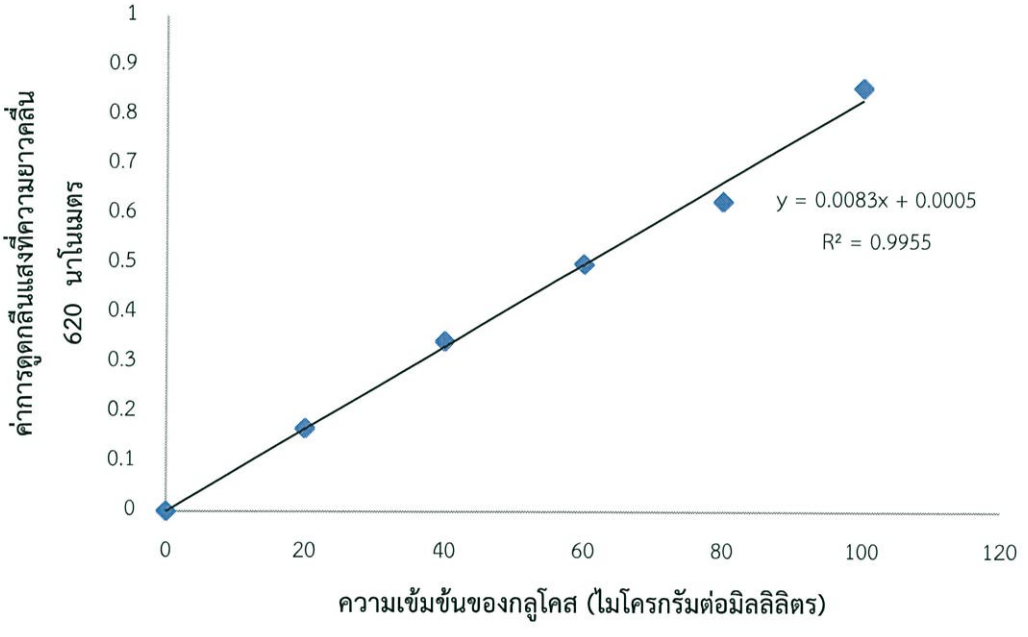
4. แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งจนทุกหลอดเย็นลงจนถึงประมาณ 0 องศาเซลเซียส

5. นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

7. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปภาคผนวกที่ 4ข) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน) x (1000)}}$$



รูปภาคผนวกที่ 4ข กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

6. การคำนวณหาปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์

ปริมาณของเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ คำนวณได้จาก

ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) เท่ากับ น้ำตาลทั้งหมด ลบ น้ำตาลซูโครส และ น้ำตาลรีดิวซ์

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองและการคำนวณทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 1ค ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเหลว

เวลา (ชั่วโมง)	สูตรอาหาร	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ3		
48	สูตร 1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	สูตร 2	0.25	0.12	0.07	0.14	0.09
	สูตร 3	0.13	0.22	0.10	0.15	0.06
	สูตร 4	0.57	0.59	0.38	0.51	0.11
96	สูตร 1	0.04	0.03	0.09	0.06	0.03
	สูตร 2	0.13	0.17	0.21	0.17	0.04
	สูตร 3	0.20	0.56	0.13	0.30	0.23
	สูตร 4	0.29	1.02	0.96	0.76	0.41
144	สูตร 1	0.09	0.04	0.13	0.09	0.05
	สูตร 2	0.15	0.33	0.15	0.21	0.10
	สูตร 3	0.57	0.41	0.20	0.39	0.18
	สูตร 4	1.01	0.87	1.12	1.00	0.12
192	สูตร 1	0.16	0.15	0.25	0.19	0.05
	สูตร 2	0.68	0.46	0.42	0.52	0.14
	สูตร 3	0.25	0.65	0.65	0.52	0.23
	สูตร 4	2.60	1.21	1.57	1.80	0.72
240	สูตร 1	0.38	0.28	0.28	0.31	0.06
	สูตร 2	0.99	0.99	1.08	1.02	0.06
	สูตร 3	1.49	0.54	0.50	0.84	0.57
	สูตร 4	2.83	2.64	2.57	2.68	0.13
288	สูตร 1	1.21	1.69	0.11	1.00	0.81
	สูตร 2	0.80	1.46	1.30	1.18	0.35

(ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	สูตรอาหาร	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ3		
288	สูตร 3	1.21	1.26	0.32	0.93	0.53
	สูตร 4	2.88	2.82	2.46	2.72	0.23
336	สูตร 1	1.72	0.85	0.58	1.05	0.60
	สูตร 2	1.18	1.15	1.30	1.21	0.08
	สูตร 3	0.55	1.37	0.86	0.92	0.41
	สูตร 4	3.956	4.52	0.21	2.90	2.34

ตารางภาคผนวกที่ 2ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเหลวโดยวางแผนการทดลองแบบ 4x7 factorial

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	3	24.6652	24.6652	8.2217	27.55	0.000
B	6	22.0797	22.0797	3.6800	12.33	0.000
A*B	18	6.2240	6.2240	0.3458	1.16	0.326
Error	56	16.7121	16.7121	0.2984		
Total	83	69.6810				

S = 0.546288 R-Sq = 76.02% R-Sq (adj) = 64.45%

ตารางภาคผนวกที่ 3ค การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ของสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 4 สูตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเหลวโดยวิธี Turkey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ช่องตัวแปร A คือสูตรอาหาร 4 ระดับ ดังนี้ 1=อาหารสูตรที่ 1, 2=อาหารสูตรที่ 2, 3=อาหารสูตรที่ 3 และ4=อาหารสูตรที่ 4 ตามลำดับ ส่วนช่องตัวแปร B คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 ระดับ ดังนี้ 1=48, 2=96, 3=144, 4=192, 5=240, 6=288 และ7=336 ชั่วโมง ตามลำดับ

A	B	N	Mean	Grouping
4	7	3	2.89467	A
4	6	3	2.72067	A B
4	5	3	2.67967	A B
4	4	3	1.79500	A B C
2	7	3	1.21200	A B C D
2	6	3	1.18333	A B C D
1	7	3	1.04700	B C D
2	5	3	1.02000	B C D
4	3	3	1.00200	B C D
1	6	3	1.00100	B C D
3	6	3	0.93133	C D
3	7	3	0.92433	C D
3	5	3	0.84200	C D
4	2	3	0.76000	C D
2	4	3	0.52067	C D
3	4	3	0.51700	C D
4	1	3	0.51367	C D
3	3	3	0.39100	C D
1	5	3	0.31100	C D
3	2	3	0.29700	C D
2	3	3	0.21033	C D
1	4	3	0.18533	C D
2	2	3	0.17133	C D
3	1	3	0.14733	C D

(ต่อ)

2	1	3	0.14433	C	D
1	2	3	0.05567	C	D
1	1	3	0.00800		D

ตารางภาคผนวกที่ 4ค ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ ที่มีการเติมกล้วยหอมในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 100, 140, และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกล้วย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ3		
48	100	0.76	0.98	0.96	0.90	0.12
	140	0.45	0.34	1.19	0.66	0.46
	180	0.22	0.42	0.46	0.37	0.13
96	100	2.12	3.87	1.61	2.53	1.19
	140	1.91	3.52	3.44	2.96	0.91
	180	2.10	1.84	2.10	2.01	0.15
144	100	4.14	3.72	2.98	3.61	0.59
	140	4.17	2.53	3.04	3.25	0.84
	180	2.84	3.2	3.45	3.16	0.31
192	100	3.38	3.04	4.50	3.64	0.76
	140	4.62	4.28	4.18	4.36	0.23
	180	4.34	4.58	3.67	4.20	0.47
240	100	4.16	4.78	4.41	4.45	0.31
	140	4.84	6.82	6.32	5.99	1.03
	180	5.04	6.92	5.56	5.84	0.97
288	100	4.49	5.65	4.05	4.73	0.83
	140	6.89	6.79	6.99	6.89	0.10
	180	6.57	8.13	7.42	7.37	0.78
336	100	6.72	5.93	4.86	5.84	0.93
	140	5.59	8.02	8.43	7.35	1.54
	180	8.05	8.19	6.92	7.72	0.70

ตารางภาคผนวกที่ 5ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวางแผนการทดลองแบบ 3x7 factorial

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	2	8.339	8.339	4.169	7.54	0.002
B	6	270.065	270.065	45.011	81.38	0.000
A*B	12	16.818	16.818	1.401	2.35	0.013
Error	42	23.229	23.229	0.553		
Total	62	318.451				

S = 0.743681 R-Sq = 92.71% R-Sq (adj) = 89.23%

ตารางภาคผนวกที่ 6ค การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยช่องตัวแปร A คือปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในสูตรอาหาร 3 ระดับ ดังนี้ 1=ปริมาณ 100, 2=ปริมาณ 140 และ3=ปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนช่องตัวแปร B คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 ระดับ ดังนี้ 1=48, 2=96, 3=144, 4=192, 5=240, 6=288 และ 7=336 ชั่วโมง ตามลำดับ

A	B	N	Mean	Grouping
3	6	3	7.3733	A
2	7	3	7.3467	A
2	6	3	6.8900	A B
2	5	3	5.9933	A B C
3	5	3	5.8400	A B C D
1	7	3	5.8367	A B C D
1	6	3	4.7300	B C D E
1	5	3	4.4500	C D E
2	4	3	4.3600	C D E
3	4	3	4.1967	C D E F
1	4	3	3.6400	D E F
1	3	3	3.6133	D E F
2	3	3	3.2467	E F
3	3	3	3.1633	E F G
2	2	3	2.9567	E F G H
1	2	3	2.5333	E F G H I
3	2	3	2.0133	F G H I
1	1	3	0.9000	G H I
2	1	3	0.6600	H I

ตารางภาคผนวกที่ 7ค ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีการเติมกล้วยหอมในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 100, 140, และ 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา48, 96, 144, 192, 240, 288 และ 336 ชั่วโมง คำนวณปริมาณ โดยนำปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ลบ ปริมาณน้ำตาลซูโครสและ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกล้วย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)			ค่าเฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ3		
48	100	5.45	3.99	4.59	4.68	0.74
	140	21.05	21.76	21.61	21.47	0.37
	180	9.18	9.73	6.83	8.58	1.54
96	100	15.08	14.07	14.42	14.52	0.51
	140	12.53	13.87	12.65	13.02	0.74
	180	3.10	3.91	5.24	4.38	0.75
144	100	12.07	11.68	11.94	11.89	0.20
	140	9.34	7.73	12.30	9.79	2.32
	180	10.89	10.61	12.67	11.39	1.12
192	100	14.58	13.77	13.95	14.10	0.43
	140	8.45	8.68	8.93	8.69	0.24
	180	26.82	25.93	25.99	26.25	0.50
240	100	12.92	12.40	13.54	12.96	0.57
	140	16.99	16.38	16.62	16.67	0.31
	180	15.56	14.82	15.62	15.33	0.45
288	100	18.14	18.43	19.93	18.83	0.96
	140	27.78	29.18	28.52	28.50	0.70
	180	21.86	22.00	22.80	22.22	0.50
336	100	14.96	15.11	16.12	15.40	0.63
	140	33.14	32.51	33.36	33.00	0.44
	180	39.75	39.14	37.74	38.87	1.03

ตารางภาคผนวกที่ 8ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในสูตรอาหาร โดยมีปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยวางแผนการทดลองแบบ 3x7 factorial ซึ่งมีผลต่อปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	2	388.45	388.45	194.23	262.58	0.000
B	6	2645.00	2645.00	440.83	595.97	0.000
A*B	12	1808.43	1808.43	150.70	203.74	0.000
Error	42	31.07	31.07	0.74		
Total	62	4872.95				

S = 0.860055 R-Sq = 99.36% R-Sq (adj) = 99.06%

ตารางภาคผนวกที่ 9ค การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยปริมาณเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์พอลิแซ็กคาไรด์ของสูตรอาหารที่มีการเติมกล้วยหอมลงไป โดยมีปริมาณ 100, 140 และ 180 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48, 96, 144, 192, 240, 288 และ336 ชั่วโมง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยช่องตัวแปร A คือปริมาณกล้วยหอมที่เติมลงในสูตรอาหาร 3 ระดับ ดังนี้ 1=ปริมาณ 100, 2=ปริมาณ 140 และ3=ปริมาณ 180 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนช่องตัวแปร B คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 ระดับ ดังนี้ 1=48, 2=96, 3=144, 4=192, 5=240, 6=288 และ 7=336 ชั่วโมง ตามลำดับ

A	B	N	Mean	Grouping
3	7	3	38.875	A
2	7	3	33.005	B
2	6	3	28.495	C
3	4	3	26.248	C
3	6	3	22.222	D
2	1	3	21.473	D E
1	6	3	18.834	E F
2	5	3	16.665	F G
1	7	3	15.398	G H
3	5	3	15.333	G H
1	2	3	14.520	G H I
1	4	3	14.100	G H I
2	2	3	13.018	H I J
1	5	3	12.955	H I J
1	3	3	11.894	I J K
3	3	3	11.388	J K
2	3	3	9.787	K L
2	4	3	8.686	L
3	1	3	8.577	L
1	1	3	4.675	M
3	2	3	4.382	M