

สภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงงั้เชื้อหิมะ
(*Isaria tenuipes*) เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

OPTIMIZATION OF INOCULUM AND *Isaria tenuipes* CULTURE FOR
BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-SC-M-020-042

สภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ
(*Isaria tenuipes*) เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

OPTIMIZATION OF INOCULUM AND *Isaria tenuipes* CULTURE FOR
BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา เลขพ.ศ. 2561 ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2018-SC-M-020-042

OPTIMIZATION OF INOCULUM AND *Isaria tenuipes* CULTURE FOR
BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCTION



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้เชิงพาณิชย์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
2018
KMUTL-2018-SC-M-020-042



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

COPYRIGHT 2018

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ (<i>Isaria tenuipes</i>) เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศันสนีย์ ภูประกิจ
รหัสประจำตัว	57605129
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. มาริสสา จาคุพรพิพัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ อันดับแรกได้ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราถังเช่าหิมะ เส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA เสริมและบนดักแด้ใหม่เป็นเส้นใยสีขาวฟู เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าถังเช่าหิมะสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน และสร้าง conidia มีรูปร่างรี เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ ส่วนดอกเห็ดถังเช่าหิมะ (fruiting body) ที่เจริญบนดักแด้ใหม่ ดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะรูปร่างคล้ายปากรัง กิ่งก้านแตกแขนง กับคอร์นินไดโอสปอร์จำนวนมาก และจากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) โดยการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) ทำการศึกษาปัจจัยด้วยกัน 3 ปัจจัย คือความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาณอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ ตัวแปรตามคือน้ำหนักเส้นใยแห้ง จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเร็วของการเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ปริมาณอาหารในพลาสติก 105 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อที่ 106 ชั่วโมง สามารถผลิตเส้นใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 14.03 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งธาตุโพแทสเซียม ที่มีผลต่อการสร้างดอกเห็ดและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการศึกษาที่ละปัจจัย และพบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากข้าวเหนียวดำลิมผั่ว 40 กรัม เสริมด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตร สามารถผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารพอลิแซ็กคาไรด์ ดีที่สุดเท่ากับ 1.03 ± 0.04 และ 0.23 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ดอกเห็ดเจริญบนข้าวไรซ์เบอร์รี่ดีที่สุด น้ำหนักดอกเห็ดแห้ง เท่ากับ 2.16 ± 0.11 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด แต่พบว่าสารอะดีโนซีนจากแหล่งคาร์บอนทั้งสอง ข้าวไรซ์เบอร์รี่และข้าวเหนียวดำลิมผั่ว ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามข้าวเหนียวดำลิมผั่วได้ถูกคัดเลือกในการทดลองที่

เหลืออยู่ การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด คือ ยีสต์สกัด เปปโตน ไข่ไก่ กากถั่วเหลืองบด ทริปโตน และยีสต์สกัดกับเปปโตน (ชุดควบคุม) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากไข่ไก่และจากยีสต์สกัดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อผลของน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสามชนิด อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าไข่ไก่เป็นแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติที่หาได้ง่ายและมีต้นทุนที่ถูกกว่ายีสต์สกัดที่มีราคาแพง ไข่ไก่จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการทดลองถัดไป ผลของการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ได้จาก กล้วยน้ำว่า พักทอง น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะพร้าวแก่ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลของสารคอร์โดเซปิน และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด พบว่าแหล่งโพแทสเซียมที่ได้จาก กล้วยน้ำว่า และน้ำมะพร้าวอ่อน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 กับชุดควบคุม โดยให้ผลของสารคอร์โดเซปิน เท่ากับ 0.93 ± 0.13 , 0.94 ± 0.11 และ 1.04 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด เท่ากับ 1.62 ± 0.09 , 1.63 ± 0.04 และ 1.71 ± 0.14 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อชวด ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียม ที่ได้จากน้ำมะพร้าวอ่อน สามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดเท่ากับ 108.91 ± 1.90 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากข้าวเหนียวดำลิ้มผิว 40 กรัมต่อชวด แหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่สด (ความเข้มข้นของไนโตรเจน 1.34 กรัมต่อลิตร) ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิตร ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม และดักแด้ใหม่ 30 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิตร เป็นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมและสามารถลดต้นทุนในการผลิตถังเช่าหิมะสำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับการค้า

คำสำคัญ : คอร์โดเซปิน ถังเช่าหิมะ พอลิแซ็กคาไรด์ สภาวะเหมาะสม พื้นผิวตอบสนอง อะดีโนซีน

Thesis Title	Optimization of inoculum and <i>Isaria tenuipes</i> culture for bioactive compounds production
Student Name	Miss Sunsune Phuprakt
Student ID	57605129
Degree	Master of Science (biotechnology)
Department	Biology
Year	2018
Thesis advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Marisa Jatupornpipat

ABSTRACT

In this research was to study optimal conditions for production of an inoculum and culture of *Isaria tenuipes* for bioactive compounds production. The morphology of studied. Its colonies on PDA and silkworms pupa are white. The morphological characteristics under the microscope, *I. tenuipes* produces septate hypha, conidia are oval at the top of the conidiophore. The lengths fruiting bodies of *I. tenuipes* growing on silkworms pupa of fruiting bodies are between 2-3 cm with pale yellow. The shape of fruiting bodies was coral-like, many branched types with numerous conidiospores. Subsequently, the study optimal conditions for production of an inoculum of *Isaria tenuipes* using Response Surface Methodology (RSM). The three parameters of this study were shaking speed, medium capacity in 250 ml flask and cultural time by using Central Composite Design. The results were determined by dry weight of the mycelia of *I. tenuipes*. The optimal culture conditions for the inoculum preparation were 180 rpm, 105 ml and 106 h, respectively. Under this condition, the highest dry weight of mycelium was 14.03 g/l.

The effects of various carbon and nitrogen and potassium sources on the production of bioactive compounds of fruiting bodies by solid cultivation of *Isaria tenuipes* were investigated. The carbon sources were examined; Rice berry Rice, Homnin Rice, Sangyod Rice, Leum Pua glutinous Rice and Mun-pu Rice. The experiments showed that Leum Pua glutinous Rice 40 gram per bottle with 60 ml. of liquid medium were found to be most favorable to cordycepin and polysaccharide

production ($p < 0.05$), whereas fruiting bodies grew best in Rice berry Rice. The dry fruiting bodies weight was 2.16 ± 0.11 gram dry weight per bottle and adenosine production of both carbon source were not statistically significant differences at 95 %. However, Leum Pua glutinous rice was selected in the remaining trials. Effect of nitrogen source types of fruiting bodies and bioactive compounds production. Six kinds of nitrogen sources are yeast extract, peptone, egg, soybean meal, tryptone and yeast extract with peptone (control). The experiments showed that yeast extract and eggs were not statistically significant differences ($p < 0.05$) for dry fruiting bodies and production of cordycepin, adenosine and polysaccharide. But egg was selected in the next experiment. Effect of potassium source types of fruiting bodies and bioactive compounds production from Namwa banana, pumpkin, young (green) coconut water and mature (brown) coconut water. It was found that Namwa banana and young coconut water were equivalent in terms of cordycepin and fruiting bodies production were not statistically significant differences ($p < 0.05$) with control are 0.93 ± 0.13 , 0.94 ± 0.11 and 1.04 ± 0.11 mg/g (dry weight) and 1.62 ± 0.09 , 1.63 ± 0.04 and 1.71 ± 0.14 g (dry weight)/bottle, respectively. Whereas, polysaccharide production best in young coconut water was 108.91 ± 1.90 mg/g (dry weight) a result has statistical significance ($p < 0.05$).

Therefore, the *Isaria tenuipes* culture of carbon source from Leum Pua glutinous Rice about 40 grams per bottle and nitrogen source from eggs (nitrogen concentration 1.34 g/l) mixed with 60 ml of liquid medium (200 grams of potato, 50 grams of baby corn, and 30 grams of silkworm pupa in distilled water 1 L) It is suitable for cultivating and reducing the cost of producing *Isaria tenuipes* for commercial.

Keywords : Adenosine, Cordycepin, *Isaria tenuipes*, Optimization, Polysaccharide
Response surface design

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดีด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาเสียสละเวลาเพื่อให้ความรู้ คำแนะนำ แนวทางในการดำเนินงาน ค้นคว้าวิจัย รวมถึงแนวทางในการแก้ปัญหาระหว่างการดำเนินงาน อีกทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการเป็นประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย อาจารย์บัณฑิตประจำสาขา และ ดร. วรภัทร สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการดำเนินงานค้นคว้าวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และเป็นกำลังใจให้เสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณกิจสิทธิ์ พรหมสุทธ์ ที่ให้คำปรึกษาคำแนะนำและช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา นอกจากนี้ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความสะดวกในการดำเนินการวิจัยในด้านสถานที่ อุปกรณ์และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ

ศันสุนีย์ ภู่อะกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ราแมลง.....	3
2.2 การดำรงชีวิตของเชื้อรา.....	5
2.3 กลไกการทำลายแมลงอาศัยของราแมลง.....	5
2.4 การสืบพันธุ์ของราแมลงใน Genus <i>Cordyceps</i>	6
2.5 ถั่งเช่าหิมะ (<i>Isaria tenuipes</i>).....	6
2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะที่ศึกษาและวิจัย.....	8
2.4.1 คอไรโดเซปินและคุณสมบัติทางเคมีของคอไรโดเซปิน.....	8
2.4.2 สารอะดีโนซีน.....	10
2.4.3 สารพอลิแซ็กคาไรด์.....	11
2.7 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราแมลง.....	12
2.8 การเพาะเลี้ยงถั่งเช่าและวัตถุดิบทางการเกษตรสำหรับการเพาะเลี้ยง.....	18
2.9 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ.....	27
บทที่ 3 เครื่องมืออุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	34
3.1 เครื่องมืออุปกรณ์.....	34
3.1.1 เครื่องมือ.....	34
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	35
3.1.3 วัตถุดิบ.....	35
3.1.4 เชื้อจุลินทรีย์.....	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ อธิการบดีมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คัดลอกสิ่งนี้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนได้โดยไม่ต้องขออนุญาตจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	35
3.2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการวิจัยและการเก็บรักษา.....	35
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อเห็ดถั่งเช่าหิมะ	36
3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ	36
3.4.1 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง Central Composite Design (CCD)	36
3.4.2 การสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ทางสถิติ.....	37
3.4.3 วิธีการเลี้ยงหัวเชื้อ.....	37
3.4.4 วิธีการการวิเคราะห์ผลน้ำหนักระหว่างเส้นใยแห้ง	37
3.5 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	38
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อเหลว.....	39
3.5.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	39
3.5.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	40
3.5.4 การศึกษาชนิดของธาตุโพแทสเซียมที่มีผลต่อการเจริญของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	40
3.5.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง	41
3.5.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด	41
3.5.5.2 การวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีน	41
3.5.5.3 การวิเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์	41
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	43
4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาเบื้องต้นของถั่งเช่าหิมะ	43
4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะของเส้นใยถั่งเช่าหิมะบนอาหารแข็งและดักแด่ใหม่	43
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ	44
4.2.1 ผลศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง.....	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ในชื่อโครงการวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือใช้
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกสิ่งนี้ไปทำและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	53
4.3.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	53
4.3.2 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	55
4.3.3 การศึกษาการเสริมธาตุโพแทสเซียมที่มีต่อการเจริญเติบโตของข้าวหอมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	60
เอกสารอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	77
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ผล	79
ภาคผนวก ค รูปการทดลอง.....	88
ภาคผนวก ง ผลวิเคราะห์ค่าสถิติ.....	95
ประวัติผู้เขียน	107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 กิจกรรมทางชีวภาพของถั่งเช่า.....	4
2.2 องค์ประกอบทางเคมีในดอกเห็ดของถั่งเช่าหิมะ.....	8
2.3 กรดอะมิโนในดอกเห็ดของถั่งเช่าหิมะ.....	8
2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของข้าว.....	18
2.5 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาต่อวัตถุดิบ 100 กรัม.....	24
2.6 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างวัตถุดิบธรรมชาติที่ใช้เพาะเห็ดถั่งเช่าต่อ 100 กรัม.....	25
2.7 องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองแยกเปลือก.....	26
2.8 ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย 5 ระดับ....	29
3.1 ค่าระดับของแต่ละปัจจัย ในแผนการทดลอง CCD ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ.....	37
3.2 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 5 ระดับ.....	38
4.1 ผลการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตหัวเชื้อของเห็ดถั่งเช่าหิมะ.....	45
4.2 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (Xi) โดยโปรแกรม SPSS.....	46
4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน.....	48
4.4 การยืนยันผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งกับปัจจัยที่คัดเลือกจากพื้นที่ผิวตอบสนอง.....	52
4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ.....	54
4.6 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ.....	56
4.7 ผลของธาตุโพแทสเซียมที่มีผลต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ.....	58
ข1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส.....	83
ง1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	95
ง2 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	95
ง3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยไม่ให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม ถือว่าท่านมีหน้าที่ปกปิดข้อมูลและต้องแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคอร์ไดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	96
ง5 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของคอร์ไดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	96
ง6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของคอร์ไดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	96
ง7 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	97
ง8 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	97
ง9 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	97
ง10 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	98
ง11 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	98
ง12 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	98
ง13 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	99
ง14 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	99
ง15 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	99
ง16 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคอร์ไดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง17 คำวิเคราะห์ความแปรปรวนของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่ง ผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	100
ง18 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของคอร์โดเซปินของ การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	100
ง19 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่ง ไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	101
ง20 คำวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	101
ง21 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารพอลิแซ็กคา ไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและ การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	101
ง22 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตร เจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	102
ง23 คำวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผล ต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	102
ง24 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของ การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	102
ง25 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารอะดีโนซีนของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุ โพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	103
ง26 คำวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารอะดีโนซีนของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	103
ง27 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารอะดีโนซีนของการ ศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	103
ง28 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารคอร์โดเซปินของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุ โพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	104
ง29 คำวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารคอร์โดเซปินของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียม ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	104

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง30 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารคอร์ไคเซปินของ การศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อกา เจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและการ ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	104
ง31 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาการเสริมแร่ ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพ.....	105
ง32 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซ ียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	105
ง33 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สาร พอลิแซ็กคาไรด์ ของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและ การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	105
ง34 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุ โพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ...	106
ง35 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	106
ง36 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของ การศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเช่าหิมะและการ ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กลไกการทำลายแมลงอาศัยของราแมลง.....	6
2.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ	7
2.3 ถังเช่าหิมะ.....	7
2.4 โครงสร้างทางเคมีของคอร์ไดเซปิน	9
2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารอะดีโนซีน	10
2.6 ลักษณะของเมล็ดข้าวที่นำมาทดลอง.....	21
2.7 กราฟโครงสร้างพื้นผิวตอบสนอง.....	28
2.8 รูปแบบการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design 3 ปัจจัย 2 ระดับ	30
4.1 ลักษณะสัณฐานเบื้องต้นของถังเช่าหิมะ.....	43
4.2 ผลของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรและความเร็วรอบของการเขย่าที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง	49
4.3 ผลของเวลาในการเลี้ยงเชื้อและความเร็วรอบของการเขย่าที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง	50
4.4 ผลของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง	51
ข1 กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	80
ข2 กราฟมาตรฐานของคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร.....	80
ข3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร.....	81
ข4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิกไซคลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	82
ค1 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน นาที่ที่ 11.436 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	88
ค2 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารมาตรฐานอะดีโนซีน นาที่ที่ 9.465 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	88

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
ค3 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างที่สกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เพาะเลี้ยง บนในข้าวเหนียวดำลิ้มผิวในศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ ถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	88
ค4 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างในศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อ การเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	89
ค5 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างในศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อ การเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	89
ค6 ลักษณะเส้นใยของถั่งเช่าหิมะที่เจริญบนเมล็ดข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน.....	90
ค7 ลักษณะการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าหิมะที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียว ดำลิ้มผิว.....	91
ค8 ลักษณะดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะเจริญบนเมล็ดข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน.....	92
ค9 ลักษณะดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียวดำลิ้มผิว....	93
ค10 ลักษณะดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะเสริมด้วยแหล่งโพแทสเซียมเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียวดำลิ้มผิว...	94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*) หรือชื่อเดิม *Paecilomyces tenuipes* เป็นราแมลงอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes (Bunyapailboonsri *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2010) ชาวเกาหลีจะเรียกสมุนไพรมันว่า Snow-flake Dong ChoongHaCho (Nam *et al.*, 2001) ราชนิดนี้เป็นปรสิตในดักแด้หรือตัวอ่อนของผีเสื้อในสกุล Lepidoptera (Xu *et al.*, 2006) ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงสปอร์ของเชื้อราจะเป็นปรสิตในตัวอ่อนหนอน และสร้างเส้นใยเจริญเติบโตโดยรับสารอาหารภายในตัวหนอน จากนั้นเส้นใยจะรวมตัวกันหนาแน่นเจริญเป็นส่วนที่เรียกว่าฟรุตติงบอดีที่ยื่นออกมาจากซากของหนอนในช่วงฤดูร้อน (Nam *et al.*, 2001)

ในปัจจุบันมีการศึกษาและค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในเห็ดถั่งเช่าเพิ่มมากขึ้น เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ (Xu *et al.*, 2003) สารกลุ่มนิวคลีโอไซด์ เช่น อะดีโนซีน (adenosine) คอร์ดิเซปิน (cordycepin) หรือ 3'-deoxyadenosine (Du *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015) และซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) (Park *et al.*, 2011) เป็นต้น สรรพคุณของสารเหล่านี้มีความสำคัญในทางการแพทย์และเภสัชวิทยาเป็นอย่างมาก สามารถช่วยฟื้นฟูระบบร่างกายให้แข็งแรงส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มการไหลเวียนเลือด (Chen *et al.*, 2008) ช่วยลดน้ำตาลในเลือด (Park *et al.*, 2011) สามารถรักษาอาการของโรคภูมิแพ้โรคหอบหืดและวัณโรค (Zhu *et al.*, 1998) ด้านการเกิดเนื้องอก (Kim *et al.*, 2011) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในเซลล์มะเร็งต่างๆ (Nam *et al.*, 2011) และสามารถก่อให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Park *et al.*, 2000) ทั้งนี้ยังค้นพบว่าถั่งเช่าหิมะสามารถลดระดับไขมันในหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูงได้ (Che *et al.*, 2014) จากความหลากหลายทางคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ ทำให้ถั่งเช่าหิมะมีศักยภาพที่นำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เป็นแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรค อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์

ในปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในดักแด้ไหมหรือแมลงชนิดอื่น ทั้งนี้ดักแด้ไหมและแมลงมีราคาแพงและมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยง และให้ผลผลิตที่ต่ำ ไม่เหมาะต่อการเลี้ยงขนาดใหญ่ในเชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยพบว่า การนำเอาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง และเมล็ดข้าวมาทดลองในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่า โดยเฉพาะในเมล็ดข้าวเป็นแหล่งพลังงานและมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหลายชนิด ผู้วิจัยจึงสนใจที่ศึกษาแหล่งอาหารโดยใช้ข้าวเป็นองค์ประกอบหลักของแหล่งคาร์บอน และวัตถุดิบทางการเกษตรอื่น ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งแร่ธาตุเสริมที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่นมาทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะ โดยศึกษา

เปรียบเทียบอัตราการเจริญและผลผลิตที่ได้ และวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาที่สำคัญ 3 ชนิด คือ คอร์โคไดเซพิน อะดีโนซีน และพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อพัฒนาปรับปรุงผลผลิต และเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ก่อให้เกิดประโยชน์สำหรับผู้ประกอบการและผู้สนใจเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะ
2. เพื่อศึกษาการใช้ข้าวและวัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน และเป็นแหล่งแร่ธาตุ เพื่อเพิ่มผลผลิตของเห็ดถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อถั่งเช่าหิมะในสภาวะอาหารเหลวโดยการศึกษปัจจัยที่มีผลร่วมกันต่อการเจริญของหัวเชื้อ คืออัตราการเขย่า ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติก 250 มิลลิลิตรและเวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองและวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง วัดผลการเจริญของเชื้อราโดยการวัดน้ำหนักเส้นใยแห้ง
2. ทำการศึกษาการเจริญของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสภาวะอาหารแข็ง โดยใช้เมล็ดข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน 5 ชนิด คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวมันปูแดง ข้าวหอมนิล และข้าวเหนียวดำลิ้มผิว
3. ทำการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน 6 ชนิด คือ ยีสต์สกัด เปปโตน ไข่ไก่ กากถั่วเหลือง ทริปโตน และยีสต์สกัดผสมเปปโตน (Park *et al.*, 2001) ที่ส่งผลต่อการเจริญของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
4. ทำการศึกษาผลของแร่ธาตุโพแทสเซียมจาก กล้วย ฟักทอง น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ ที่ส่งผลต่อการเจริญของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารคอร์โคไดเซพิน อะดีโนซีน วิเคราะห์โดยใช้ HPLC (Wang *et al.*, 2015) และพอลิแซ็กคาไรด์ (Zhu *et al.*, 2016) วิเคราะห์โดยวิธีฟินอล ซัลฟิวริค (Dubois *et al.*, 1956) ร่วมกับวิธี DNS method (Miller, 1959) จากดอกเห็ดอายุ 25 วัน หลังใช้แสงในการเพาะเลี้ยง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้ข้าวและวัสดุทางการเกษตรที่หลากหลายเป็นแหล่งอาหารในการผลิตถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้
2. สามารถเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะที่มีคุณภาพ และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญทางการแพทย์ได้ปริมาณที่สูง
3. นำองค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยไปใช้ในการสอนแก่ผู้สนใจ และเป็นแนวทางต่อยอดสู่งานวิจัยอื่นๆ ตลอดจนนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ราแมลง

ราแมลง (entomopathogenic Fungi) เชื้อราในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับแมลง ดำรงชีวิตแบบปรสิต สามารถเจริญเติบโตได้ในแมลง อาจอยู่ร่วมกับแมลงที่มีชีวิตหรือทำให้เกิดโรคและสามารถฆ่าแมลงได้ โดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราเป็นการสร้างเส้นใยแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลงอาศัย (host) มีผลทำให้แมลงขาดอากาศ รวมทั้งการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น destruxin จากเชื้อราในสกุล *Metorhizium*, hissutellin จากเชื้อราในสกุล *Hirsutella* และ beauvericin จากเชื้อราในสกุล *Beauveria* sp. เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตาย จึงอาจกล่าวได้ว่า ราแมลงมีการผลิตสารทุติยภูมิ ที่มีแนวโน้มในการนำไปเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดแมลง (insecticide) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีบทบาทสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตได้

นักวิจัยไปโอเทคได้ทำการสำรวจและศึกษาราแมลง จากอุทยานแห่งชาติต่าง ๆ ในประเทศไทย รวมถึงจากพื้นที่ป่าทั่วประเทศ พบราในกลุ่มนี้มากกว่า 400 ชนิด แต่ไม่มีกี่ชนิดที่มีบทบาทสำคัญทางการแพทย์ เช่นราแมลงในกลุ่ม ถังเช่า ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมและทางการค้ามี 4 ชนิดคือ ถังเช่าทิเบต (*Ophicordyceps sinensis*) หรือชื่อเดิม (*Cordyceps sinensis*) ถังเช่าสีทอง (*Cordyceps militalis*) ถังเช่าหิมะ *Isaria tenuipes* และถังเช่าจ๊กจัน *Isaria sinclairii* (ฉัญญา ทะพิงค์แก, 2555)

จากการศึกษาค้นคว้าทางเภสัชวิทยา พบว่าถังเช่ามีสารสำคัญทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ (polysachharide) แมนนิทอลหรือกรดคอร์โดเซปิก (mannitol หรือ cordycepic acid) แมนโนกลูแคน (mannoglucan) เป็นต้น (Shashidhar *et al.*, 2013) สารกลุ่มนิวคลีโอไซด์ (nucleosides) เช่น อะดีโนซีน (adenosine) กัวโนซีน (guanosine) คอร์โดเซปิน (cordycepin) (Shashidhar *et al.*, 2013) โดยเฉพาะสารคอร์โดเซปิน เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในถังเช่าเท่านั้น ซึ่งในทางการค้าการวัดคุณภาพของถังเช่าจะวัดจากปริมาณของสารคอร์โดเซปิน (รัตน์ะ และณัฐพงษ์, 2018) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก คอปเปอร์ สังกะสี และอุดมไปด้วยกรดอะมิโน เช่น ไอโซลิวซีน (isoleucine) ช่วยเสริมสร้างการเจริญเติบโตและการทำงานของระบบประสาท ลิวซีน (leucine) กระตุ้นการทำงานของสมอง เพิ่มพลังให้กล้ามเนื้อ ไลซีน (lysine) ซ่อมแซมกล้ามเนื้อที่สึกหรอ เป็นสารตั้งต้นของแอลคาร์นิทีนที่ช่วยเผาผลาญไขมัน และวาเลิน (valine) ช่วยกระตุ้นสมรรถนะของสมองและช่วยประสานกันของกล้ามเนื้อ เป็นต้น (Wang *et al.*, 2015; Bhandari *et al.*, 2010) มีรายงานการวิจัยของสารเหล่านี้เกี่ยวกับกิจกรรมทางชีวภาพของถังเช่าดังในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 กิจกรรมทางชีวภาพของถั่งเช่า

กิจกรรมทางชีวภาพ	แหล่งที่มา	กิจกรรมทางชีวภาพ	แหล่งที่มา
เสริมสมรรถภาพทางเพศ	Lin <i>et al.</i> , 2007 Yu <i>et al.</i> , 2007	ต้านการเกิดเส้นใยพังพืด	Nan <i>et al.</i> , 2001
ต้านการอักเสบ	Yu <i>et al.</i> , 2004 Won and Park. 2005	ลดน้ำตาลในเลือด	Choi <i>et al.</i> , 2004 Yu <i>et al.</i> , 2007 Balon <i>et al.</i> , 2002
ยับยั้งอนุมูลอิสระ	Yu <i>et al.</i> , 2007 Cho <i>et al.</i> , 2003	ลดไขมันในเส้นเลือด	Yu <i>et al.</i> , 2004
ยับยั้งเซลล์เนื้องอก ต้านมะเร็ง ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว	Chen <i>et al.</i> , 1997 Bok <i>et al.</i> , 1999 Liu <i>et al.</i> , 2014 Muller <i>et al.</i> , 1977 Kodama <i>et al.</i> , 2000 Penman <i>et al.</i> , 1970	บรรเทาอาการโรคเบาหวาน	Choi <i>et al.</i> , 2004
ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ	Chen <i>et al.</i> , 2004	ต้านโรคมะเร็ง	Sugar and McCaffrey. 1998
ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง	Liu <i>et al.</i> , 1997	Neuroprotective ป้องกันเซลล์ประสาท	Ribeizom. 1995 Gu <i>et al.</i> , 2007
สร้างภูมิคุ้มกันร่างกาย	Lin and Chiang. 2008 Sone <i>et al.</i> , 1985 Mao and Zhong. 2006	ขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย	Yoo <i>et al.</i> , 2004
ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพเช่น ไวรัส, แบคทีเรีย, เชื้อรา และ เชื้อปรสิต	Park. 1996 Ahn <i>et al.</i> , 2000 Lin and Chiang. 2008 Mueller <i>et al.</i> , 1991	ต้านเชื้อเอชไอวี	Mueller <i>et al.</i> , 1991
ลดอาการเหนื่อยล้า	Mao and Zhong. 2006	ป้องกันการเสื่อมของตับ	Jung <i>et al.</i> , 2004 Won and Park. 2005
ควบคุมการไหลของเลือด ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด	Berne. 1980	ป้องกันการเสื่อมของไต	Wu <i>et al.</i> , 2000 Yu <i>et al.</i> , 2007

2.2 การดำรงชีวิตของเชื้อรา

เนื่องจากเชื้อราไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ดังนั้นการดำรงชีวิตส่วนมากจึงต้องอาศัยอาหารสำเร็จรูปที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ อินทรีย์สารจากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว โดยเชื้อราจะปล่อยเอนไซม์มาย่อยสลาย จึงเกิดการเน่าเปื่อยผุพังเป็นสารอินทรีย์ขนาดเล็ก สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยทั่วไปแล้วการดำรงชีวิตของเชื้อรามีหลายแบบดังนี้

2.2.1 saprophyte ผู้ย่อยสลายเศษอินทรีย์ คือปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายอินทรีย์สาร แล้วดูดซึมเข้าสู่เซลล์หรือร่างกาย เช่น ซากพืชหรือซากสัตว์ต่าง ๆ เป็นอาหาร เชื้อราเหล่านี้ไม่สามารถเจริญบนสิ่งที่มีชีวิตได้จึงจัดว่าเป็นพวก obligate saprophyte

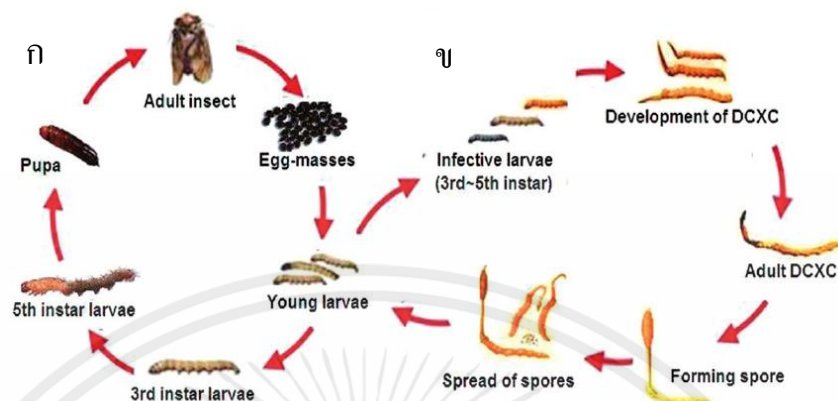
2.2.2 พาราไซต์ เป็นเชื้อราที่ได้อินทรีย์สารจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งเชื้อราพวกนี้บางชนิดเจริญเฉพาะในสิ่งที่มีชีวิตเท่านั้น เรียกว่า พาราไซต์ที่แท้จริง (obligate parasite) แต่บางชนิดสามารถเจริญบนสิ่งที่มีชีวิตและเมื่อสิ่งมีชีวิตนั้นตาย ก็เจริญบนซากสิ่งมีชีวิตนั้นอีก เรียกเชื้อราพวกนี้ว่า facultative parasite

2.2.3 mutualism เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน เช่น ไลเคนส์ เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อรากับสาหร่าย เชื้อราต้องการอาหารสำเร็จรูปเพื่อการดำรงชีวิต แต่บางกรณีพบว่าในขณะที่มีคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น กลูโคสและมอลโตส และไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งเกลือแร่ที่จำเป็นบางชนิด เชื้อราจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนขึ้นเองได้ จากการศึกษาพบว่ามีแร่ธาตุบางอย่างที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน โบรอน แมงกานีส ทองแดง เหล็ก สังกะสีและแคลเซียม ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน รองลงมา ได้แก่ สารประกอบพวกแอมโมเนียและไนเตรต เมื่อเชื้อราได้รับอาหารเข้าสู่เซลล์ ส่วนหนึ่งจะนำไปใช้ ส่วนที่เหลือจะเก็บสะสมไว้ในรูปของน้ำมันและไกลโคเจน

2.3 กลไกการทำลายแมลงอาศัยของราแมลง

ราแมลงมีวงจรชีวิตที่ต้องมีแมลงอาศัย (host) ซึ่งจะมีการติดเชื้อได้ในหลายระยะของแมลงอาศัย เช่นตัวอ่อน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย โดยอาศัยสปอร์เป็นปัจจัยสำคัญของการแพร่พันธุ์ ดังรูปที่ 2.1 ก) แสดงวงจรชีวิตของแมลงอาศัยในจิ้งส *Hepialus* ซึ่งสปอร์เชื้อราจะติดบนผิวของแมลงส่วนที่เป็นบริเวณผนังลำตัวของแมลงที่มีความอ่อนบาง (cuticle) โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางชีวเคมี เพื่อให้สามารถติดอยู่กับผิวของแมลงอาศัย จากนั้นจะเกิดการสร้าง germ tube สั้นๆ ที่ราสร้างขึ้นจากสปอร์ ใช้แทงทะลุผิวหนังแมลงเข้าไปภายใน และมีการผลิตเอนไซม์ต่างๆ เช่น ไลเปสเพื่อย่อยสลายชั้นไขมัน เอนไซม์โปรตีเอส และไคตินเนส เพื่อย่อยสลายไคตินและเนื้อเยื่อเอพิเทอมีส เกิดเป็นช่องว่างทำให้เส้นใยสามารถเจริญแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ ต่อมาเริ่มพัฒนาในตัวแมลง เส้นใยมีการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณ พร้อมย่อยสลายใช้แหล่งพลังงานภายในตัวแมลง เมื่อสภาพแวดล้อมภายนอกเหมาะสม เช่น มีอุณหภูมิ และความชื้น แสงเพียงพอ ราจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สร้างเส้นใย

หนาแน่นเกิดเป็นสโตรมา (stromata) บนลำตัวแมลงที่ตายแล้ว ดังรูปที่ 2.1 ข) มีรูปร่างต่างๆ เช่น ก้านสปอร์ราที่เหมือนกิ่งไม้ หรือเหมือนกระบอง จากนั้นจะสร้าง conidia ที่เกิดบนก้านชูสปอร์ (conidiophore) จะพบในกลุ่ม Ascomycetes เช่น *Cordyceps militaris*



รูปที่ 2.1 กลไกการทำลายแมลงอาศัยของราแมลง (ก) วงจรชีวิตของแมลงในจิ้งนัส *Hepialus* และ (ข) กระบวนการพัฒนาของถั่วงอกเข้าบนตัวอ่อนหนอน

ที่มา: Zhou *et al.*, (2014)

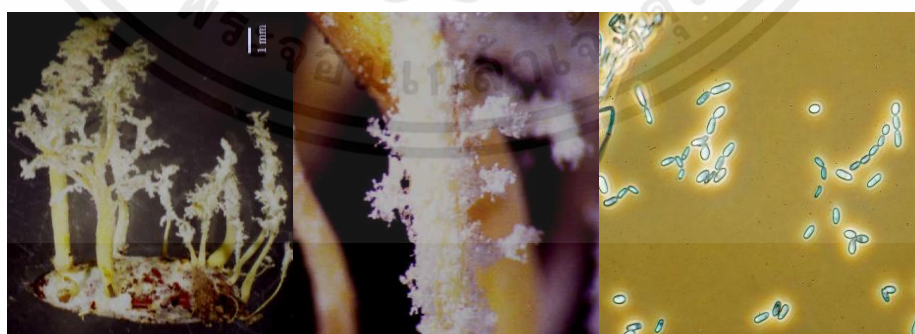
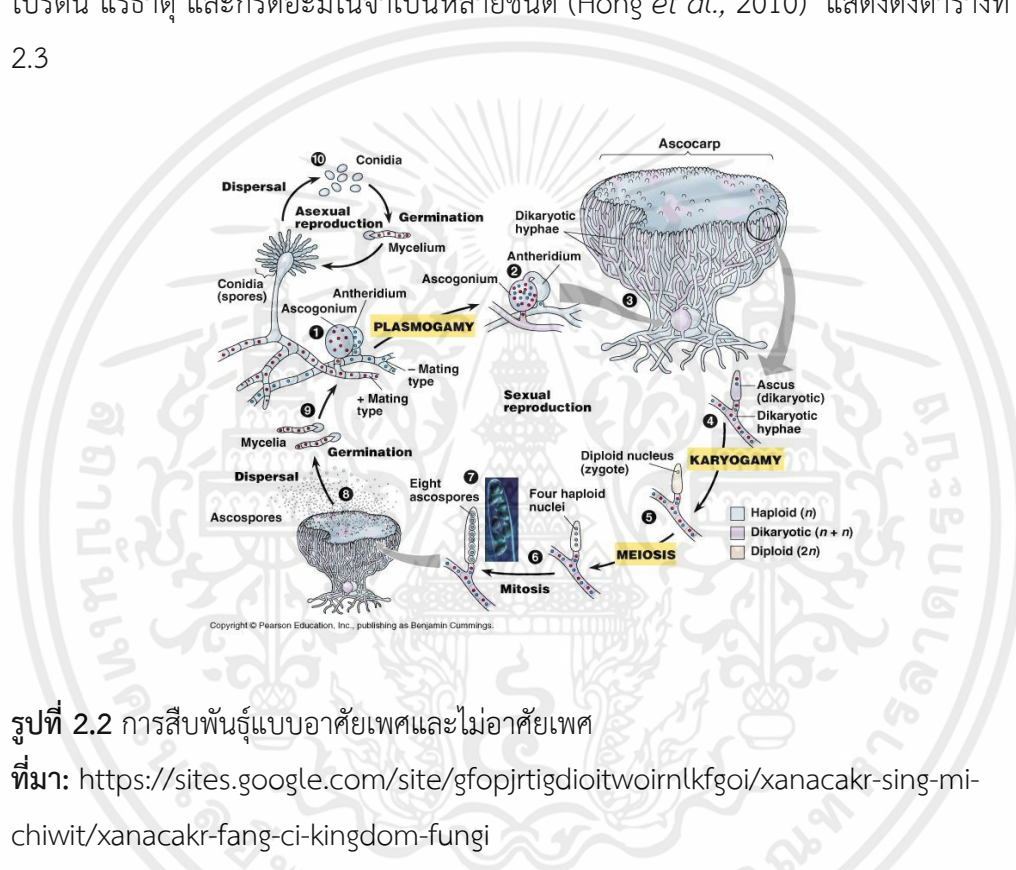
2.4 การสืบพันธุ์ของราแมลงใน Class Ascomycetes

ราใน Class Ascomycetes เป็นราชั้นสูง (Higher Fungi) มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ และแบบอาศัยเพศ ดังรูปที่ 2.2 การสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ (asexual หรือ anamorph) ราสร้างโคนิเดียม (conidium) โดยเกิดขึ้นที่ปลายของเส้นใยปกติ หรือบนก้านชูสปอร์ (conidiophore) หรือเกิดภายในโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ (fruiting body) สปอร์จะถูกสร้างขึ้นเป็นสายโดยไม่อยู่ในอับสปอร์ ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual หรือ teleomorph) สปอร์ที่เกิดแบบอาศัยเพศของพวก ascomycetes เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) เกิดภายในโครงสร้างลักษณะคล้ายถุง เรียกว่าแอสคัส (ascus) ส่วนใหญ่มักจะถูกห่อหุ้มด้วยโครงสร้างที่เรียกว่า แอสโคคาร์ป (ascocarp) ที่เรียกว่า perithecia (โครงสร้างที่มีลักษณะเป็น fruiting body ที่เรียกว่า ascocarp ซึ่งมีลักษณะปิดทำหน้าที่สร้าง ascus แต่เมื่อเจริญเต็มที่จะมีรูเปิดให้ ascospore ออกไปได้)

2.5 ถั่วงอกหิมะ (*Isaria tenuipes*)

ถั่วงอกหิมะ (*Isaria tenuipes*) หรือ *Paecilomyces tenuipes* เป็นราแมลง อยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ของอันดับ Hypocreales ในชั้น Ascomycetes (Fukatsu *et al.*, 1997) เป็นปรสิตในดักแด้หรือตัวอ่อนของผีเสื้อในสกุล Lepidoptera (Bunyapaiboonsri *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2006) พบว่ามีลักษณะของดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 2.3) มีการแตกกิ่งก้านไม่สม่ำเสมอ หรือคล้ายปะการัง ความยาว 1.5-4.7 เซนติเมตร และมีสปอร์หนาแน่นอยู่บริเวณปลาย (Kana-uchi and Fukatsu, 1999; Samson, 1974; Yamanaka *et al.*, 1998) พบได้ในพื้นที่เป็นภูเขาสูง ความสูงกว่า 3,500 เมตร เหนือจากระดับน้ำทะเล พบได้หลายแห่งในประเทศเกาหลี ญี่ปุ่น (Kang *et al.*, 2010)

ชาวเกาหลีจะเรียกสมุนไพรมันว่า Snow-flake Dong ChoongHaCho เนื่องมาจากลักษณะเฉพาะของเชื้อรา (Nam *et al.*, 2001) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในดอกเห็ดของถั่งเช่าหิมะได้รับความสนใจอย่างมากสำหรับการแพทย์เนื่องจากมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาที่หลากหลาย มีประสิทธิภาพที่ใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ เช่นโรคหอบหืด หลอดลมอักเสบ ปอด และโรคไต (Hong *et al.*, 2007) ในประเทศเกาหลี ญี่ปุ่น และจีน นำมาใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย บรรเทาอาการเมื่อยล้าและอาการเบื่ออาหาร (Sapkota *et al.* 2011) และใช้ป้องกันรักษาโรคต่างๆ (Dong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014) มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของถั่งเช่าหิมะ ประกอบไปด้วย ไขมัน โปรตีน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด (Hong *et al.*, 2010) แสดงดังตารางที่ 2.2 และ 2.3



ก

ข

ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

รูปที่ 2.3 ถั่งเช่าหิมะ ก) ดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะเจริญบนดักแด้หนอนผีเสื้อ (Lepidopteran pupa)

ข) conidiospore บนดอกเห็ด ค) ลักษณะสปอร์ของถั่งเช่าหิมะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: http://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Deutte/Paecilo/tenu/P_tenui.htm

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีในดอกเห็ดของถั่งเช่าหิมะ

ส่วนประกอบทางเคมี (ร้อยละ)				
ความชื้น	คาร์โบไฮเดรต	ไขมัน	ใยอาหาร	โปรตีน
57.56±0.07	3.49±0.00	21.46±0.00	6.20±0.26	6.83±0.02

ที่มา: Hong *et al.*, (2007)

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนในดอกเห็ดของถั่งเช่าหิมะ

กรดอะมิโนในดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
ฮิสทีดีน (Histidine)	0.61
ไอโซลิวซีน (Isoleucine)	0.64
ลิวซีน (Leucine)	1.08
เมไธโอนีน (Methionine)	0.36
ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)	0.99
ธรีโอนีน (Threonine)	1.07
วาเลีน (Valine)	0.87
อาร์จินีน (Arginine)	2.21
ไทโรซีน (Tyrosine)	1.51
ไกลซีน (Glycine)	1.77
โพรลีน (Proline)	1.68
ซีรีน (Serine)	1.19
กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid)	0.76
กรดกลูตามิก (Glutamic acid)	0.85

ที่มา: Hong *et al.*, (2007)

2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะที่ศึกษาและวิจัย

2.6.1 คอไรโดเซปินและคุณสมบัติทางเคมีของคอไรโดเซปิน

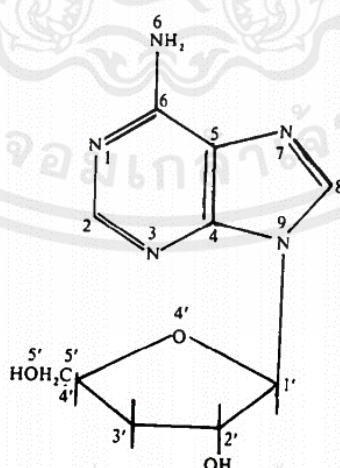
คอไรโดเซปินเป็นสารชีวภาพที่แยกได้เป็นครั้งแรกจากน้ำหมักที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Cunningham *et al.*, 1950) ซึ่งเป็นเชื้อราแมลงที่เติบโตในตัวอ่อนแมลง และดักแต่ Tuli *et al.*, (2013) ได้รายงานว่สารคอไรโดเซปิน หรือ 3'-deoxyadenosine มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_{10}H_{13}N_5O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 251.24 กรัมต่อโมล มีคุณสมบัติเป็นเบส รูปร่างเป็นผลึกเหมือนเข็มหรือเป็นเกล็ดคริสตัล มีจุดหลอมเหลวที่ 228-231 องศาเซลเซียส สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 259.0 นาโนเมตร เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับอะดีโนซีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (DNA) แต่แตกต่างโดยไม่มีกลุ่มของไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่ง 3 ตรงส่วนของน้ำตาลไรโบส (Ribose) (รูปที่ 2.4) โครงสร้างของคอไรโดเซปินประกอบด้วยพิวรีน (อะดีนีน) โมเลกุลของนิวคลีโอไซด์ยึดติดกับน้ำตาลไรโบส (ไรโบฟูราโนส) เชื่อมต่อกันด้วยโดยพันธะ

β -N9-glycosidic

จากการขาดของหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่ง 3 มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เพราะหากคอร์โดเซปินเข้าแทนที่อะดีโนซีนในดีเอ็นเอ การขาดออกซิเจนไปหนึ่งตัวจะทำให้การจำลองดีเอ็นเอหยุดลง การแบ่งเซลล์จึงไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ การแบ่งเซลล์หากเกิดในเซลล์ปกติ ซึ่งเซลล์ปกติของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถซ่อมแซมปัญหานี้ได้ แต่ไม่ใช่ในเซลล์มะเร็งเนื่องจากในเซลล์มะเร็งไม่มีคุณสมบัติในการซ่อมแซมตัวเอง แบคทีเรียส่วนใหญ่และไวรัสทุกชนิดรวมทั้งไวรัสเอดส์ (HIV) ก็ไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับเซลล์มะเร็ง ดังนั้นความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดและไวรัสบางชนิด โดยคอร์โดเซปินก็มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันที่เกิดกับเซลล์มะเร็งนั่นเอง กลไกการออกฤทธิ์ของถั่งเช่านั้นมีหลายรูปแบบ ที่นำไปสู่การต่อต้านเซลล์มะเร็งที่ได้อธิบาย เช่นการเกิดโดยตรงจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง การตายของเซลล์มะเร็งแบบที่มีโปรแกรมไว้แล้ว ยับยั้งการเพิ่มปริมาณของกรด ribonucleic (RNA) และการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกับสารต้านอนุมูลอิสระ การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Xiao and Zhong. 2007; Buenz *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2009) อาจสรุปได้ว่าคอร์โดเซปิน สามารถเป็นสารต้านมะเร็งเนื่องจากสารคอร์โดเซปินทำลายการถอดรหัสลำดับเบสของดีเอ็นเอ ทำให้ไม่เกิดการสร้างโปรตีนที่เป็นอาหารของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตช้า หรือหยุดการเจริญเติบโต

Choi *et al.*, (2011) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำของสารคอร์โดเซปินจากถั่งเช่าในการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ 2 ชนิด คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 ผลปรากฏว่าสารคอร์โดเซปิน สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิดได้เป็นอย่างดี

Yoshikawa *et al.*, (2007) ได้ศึกษาศักยภาพของสารคอร์โดเซปินจาก ถั่งเช่าในการยับยั้งให้เซลล์ตั้งต้นของมะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (promyelocytic leukaemia) (HL 60) ไม่สามารถเจริญเติบโตได้



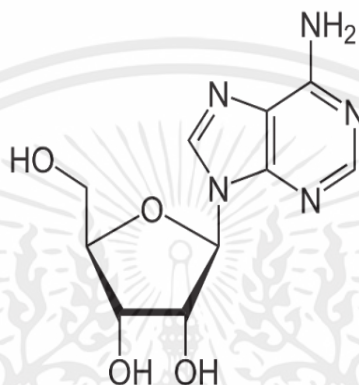
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของคอร์โดเซปิน

ที่มา: Radwan and Wilson (1980)

2.6.2 สารอะดีโนซีน

สูตรโครงสร้างทางเคมีของอะดีโนซีน คือ $C_{10}H_{13}N_5O_4$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 267.24 กรัมต่อโมล เป็นนิวคลีโอไซด์ไพวรีน (purine nucleoside) เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ประกอบขึ้นจากองค์ประกอบเพียงสองอย่างคือโมเลกุลของอะดีนีน (adenine) ที่ยึดติดกับโมเลกุลของน้ำตาลไรโบส (ribofuranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -N- glycosidic โดยใช้คาร์บอนตำแหน่งที่ 1' ของน้ำตาลเชื่อมกับไนโตรเจนตำแหน่งที่ 9' ของไพวรีน (Eltzschig, 2009) (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารอะดีโนซีน
ที่มา: Lia *et al.*, (2006)

บทบาทของอะดีโนซีนมีคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านการเกิดลิ่มเลือด อะดีโนซีนมีผลต่อการไหลเวียนของหลอดเลือดและสมอง (Toda *et al.*, 1982; Berne, 1980) และหน้าที่ในระบบเส้นประสาท เช่นการยับยั้งการปลดปล่อยสารสื่อประสาทและการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์อะดีนิเลทไซเคเลส (adenylate cyclase) (Ribeiro 1995) บทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวเคมี เช่นการถ่ายเทพลังงาน เช่น อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate ; ATP) และอะดีโนซีน ไดฟอสเฟต (adenosine diphosphate ; ADP) รวมทั้งการถ่ายทอดสัญญาณเป็นวงแหวนของอะดีโนซีน โมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate cyclic ; cAMP) ในกระบวนการทางชีวเคมี ในทางการแพทย์จะใช้เพื่อรักษาอาการหัวใจเต้นผิดปกติ โดยการชะลอการนำไฟฟ้าในหัวใจ ลดอัตราการเต้นของหัวใจหรือทำให้หัวใจเต้นเป็นปกติ ช่วยในการทดสอบความเครียดของหัวใจด้วยการเพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปยังหัวใจในทางการแพทย์ได้มีการผลิตยาที่มีส่วนประกอบของสารอะดีโนซีน โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ อะดีโนซีน คือตัวยาจะควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อและของหลอดเลือดบริเวณหัวใจโดยทำให้กล้ามเนื้อหัวใจมีแรงบีบตัวมากขึ้นหลอดเลือดเกิดการขยายตัว และยังออกฤทธิ์การทำงานของเนื้อเยื่อต้นกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าหัวใจ (Sinoatrial node) และ Atrioventricular node) ประกอบกับช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารเคมี โดยมีการสร้างสมดุลใหม่จนทำให้ภาวะการเต้นผิดจังหวะของหัวใจกลับมาเป็นปกติเหมือนเดิม บทบาทของอะดี

โนซินมีผลต่อดับ ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการสลายตัวของไกลโคเจนในรูปกลูโคส นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการสลายไขมันหรือลดไขมันและช่วยเพิ่มการดูดซึมกลูโคส ทั้งนี้อะดีโนซินเป็นส่วนสำคัญของการทำงานของเซลล์ผิว เมื่ออายุมากขึ้นปริมาณของอะดีโนซินของผิวจะลดต่ำลง ทำให้ผิวเกิดริ้วรอย (aging) และชราลง การให้ อะดีโนซินแก่ผิวเป็นเหมือนพลังงานให้ผิวสามารถซ่อมแซมตัวเองได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ (Holzer and Granstein. 2004)

2.6.3 สารพอลิแซ็กคาไรด์

นักวิจัยเริ่มมีความสนใจในเรื่องของพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อรา เนื่องจากกิจกรรมทางชีวภาพและเภสัชวิทยาต่างๆรวมถึงกิจกรรมกระตุ้นภูมิคุ้มกันและป้องกันมะเร็ง (Bae *et al.*, 2000; Lee and Kang. 1996) สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes โดยเฉพาะ *Paecilomyces japonica* มีคุณสมบัติเด่นมากมายต่อร่างกาย โดยมีโครงสร้างเป็นโปรตีนที่ซับซ้อน (polysaccharide protein complex) นำมาใช้ประโยชน์ทางยา เช่น สามารถพัฒนาเป็นตัวยาหรือสารสกัดเพื่อป้องกันการเกิดและแพร่กระจายของเนื้องอก มีกิจกรรมโดยตรงในการต้านเซลล์มะเร็งต่างๆ สามารถใช้เสริมฤทธิ์ร่วมกับการรักษาทางเคมีบำบัด (Jong *et al.*, 2013)

สารสกัดจากถั่งเช่านั้นมีส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เกิดจากกระบวนการสะสมน้ำตาลภายในตัวถั่งเช่ามีลักษณะเป็นโมเลกุลยาวเกิดจากโมโนแซ็กคาไรด์ ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไป จนถึง 1000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดต่างๆ พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในเห็ด เช่น บีต้า-กลูแคน (β -glucans) เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ที่พบในเห็ด ยีสต์ ข้าวโอ๊ต และยังพบในแบคทีเรียบางชนิด มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า องค์ประกอบในเห็ดที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ที่พบบริเวณ ฟรุตบอดี้ (fruit bodies) และไมซีเลีย (mycelium) มีโครงสร้างหลายแบบ เช่น $(1 \rightarrow 3)$, $(1 \rightarrow 6)$ - β -glucans และ $(1 \rightarrow 3)$ - α -glucans ทั้งนี้ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมพอลิแซ็กคาไรด์ ได้นำมาใช้เป็นอาหารเสริมต่อต้านอนุมูลอิสระ มีการทดลองให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน (Li *et al.*, 2001) มีสรรพคุณช่วยส่งเสริมระบบคุ้มกันของร่างกาย (Zheng *et al.*, 2005; Lee. 2011; Kuo *et al.*, 1996) ยับยั้งการเจริญและแพร่กระจายของเนื้องอก ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญของคนไข้โรคเบาหวาน (Kiho *et al.*, 1996; Bok *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2004; Balon *et al.*, 2002) และทำลายเซลล์มะเร็งและไวรัส (Mizuno *et al.*, 1995) โดยเพิ่มจำนวนเซลล์เพชฌฆาต (NK Cells) โดยเฉพาะ β -1,3-glucan หน้าที่ทั่วไปคือเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกระตุ้นการทำงานของ T-cell, B-cell และเซลล์เม็ดเลือดขาว ยับยั้งการติดเชื้อ (anti-infective) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรเอดส์ (HIV) ด้วย (Wass. 2002; Daba and Ezeronye. 2003; Silva. 2003; Liu and Zhang. 2005; Yamada *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามแม้ว่าฤทธิ์ของพอลิแซ็กคาไรด์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการรักษาเฉพาะตัวและมีบทบาทแตกต่างกันไปในการต่อต้านมะเร็งแต่ละชนิดและต้องมีปริมาณเหมาะสมจึงจะได้ผลในการรักษา

2.7 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราแมลง

2.7.1 ผลของอาหารต่อการเจริญของราแมลง

การเจริญของราบางชนิดเกิดได้โดยการใช้สารอาหารของตัวเอง บางชนิดต้องการสารอาหารจากสิ่งแวดล้อม สารอาหารมีผลต่อการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโต โดยทั่วไปมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายของเซลล์และการสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์นำไปใช้ในการเติบโต มีการเพาะเลี้ยงราในกลุ่ม *Cordyceps* ในอาหารพื้นฐาน potato dextrose agar เส้นใยสามารถเจริญได้ดี และทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส มอลโตส พบว่าราสามารถเจริญเติบโตได้ดี คาร์บอนมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการงอกของสปอร์ สารอาหารหลายชนิดที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน และกรดอะมิโนสามารถใช้เป็นอาหาร สำหรับการเกิดสปอร์ ซึ่งจะให้ผลดีเมื่อมีอัตราส่วนของคาร์บอนมากกว่าไนโตรเจน 5 เท่าหรือมากกว่านี้

ราแมลงส่วนใหญ่สามารถใช้อะลานีน โพรลีน และแอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กลูโคสหรือทรีฮาโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี บางชนิดสามารถใช้อินซิทอล (inositol) และไกลโคเจนได้ พบว่าบางชนิดสามารถใช้ไขมันอิสระได้แก่ กรดคาโปรอิก (caproic acid) กรดไมริสติก (myristic acid) กรดพาลมิติก (plamitic acid) กรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนลิก (linoleic acid) ได้ดี ราส่วนใหญ่ใช้ กลูโคส ฟรุคโตส และมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี ในขณะที่ใช้กาแลคโตสได้ไม่ดี ราหลายชนิดในกลุ่มที่เป็นพาราไซต์ของแมลง ใช้แป้งและไกลโคเจนเป็นแหล่งคาร์บอนได้

สารอาหารในกลุ่มเกลือแร่หลัก (major salt) และสารที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace element) ต่างๆ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเมื่อขาดสารอาหารนั้น โดยเฉพาะเมื่อสารอาหารนั้นขาด ไตไฮโดรเจน โบแทสเซียม ฟอสเฟต แอมโมเนียม ไนเตรต หรือแมกนีเซียม ซัลเฟต เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสังกะสีและแมกนีเซียมมีความจำเป็นต่อการเพิ่มความยาวของ germ tube

2.7.2 ผลของปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ

ราเกือบทุกชนิดเป็นพวกที่ต้องการอากาศเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโต มีความต้องการออกซิเจนโดยเฉพาะระยะออกดอก ซึ่งต้องการออกซิเจนมากกว่าระยะของเส้นใย การถ่ายเทอากาศไม่ดีส่งผลทำให้ดอกเหี่ยวไม่เจริญเติบโต ส่วนใหญ่การเจริญเติบโตถูกยับยั้งในที่ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง การทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์แปรผันไปตามชนิดของรา ส่วนราที่เป็น facultatively anaerobic สามารถใช้ออกซิเจนที่เติมลงมาในรูปแบบ Free O₂ ได้ด้วย เนื่องจากการหายใจเป็นแหล่งสำคัญของพลังงานในพวกจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน ดังนั้นออกซิเจนละลายน้ำจึงมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเจนละลายน้ำมีผลอย่างมากต่อการหายใจและเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์พวก aerobic, anaerobic และ facultatively anaerobic เมื่อค่าออกซิเจนละลายน้ำลดต่ำกว่าค่าวิกฤต อัตราการหายใจลดต่ำลง และถ้ามีความเข้มข้นของออกซิเจนสูงๆจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ทุกชนิดการเจริญเติบโตของเส้นใยของราต้องการระดับของออกซิเจนมากกว่าในช่วงที่เป็นกระบวนการการงอกของสปอร์ คาร์บอนไดออกไซด์มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของรา เพราะถูกผลิตขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการหายใจ จากการศึกษาการงอกของสปอร์และการเจริญของราในอาหารที่มีกรด

อินทรีย์ แสดงให้เห็นว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของรา ถ้า carbon dioxide partial pressure สูงขึ้นในช่วงร้อยละ 5-20 เป็นพิษต่อรา

2.7.3 ความเป็นกรด-ต่าง (pH)

ในสภาวะที่เป็นสารละลายสารที่แตกตัวให้ H^+ เรียกว่า กรด และสารที่แตกตัวให้ OH^- เรียกว่า ด่างหรือเบส pH ของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เอนไซม์ การเจริญเติบโตของราต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ ในการย่อยและการดูดซึมของอาหาร เพื่อผลิตพลังงาน pH มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของรา ราสามารถทนการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น

การเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการหมัก หรือการเพาะเลี้ยงบนอาหารรูปแบบอื่นๆ โดยทั่วไปเมื่อมีการเจริญเติบโตทำให้ pH ของสารอาหารมีความเป็นกรดมากขึ้น แต่อาจมีข้อยกเว้นได้ในบางชนิด หรือในอาหารบางประเภท ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักหรือการใช้ สับสเตรทในสารอาหารมีผลต่อค่าของ pH โดยเฉพาะกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของ น้ำตาล เช่น gluconic acid, pyruvic acid, citric acid และ by product พวก CO_2 ซึ่งเมื่อรวมตัว กับน้ำเกิดเป็นกรดคาร์บอนิก เป็นสาเหตุให้ pH ต่ำลง ในทำนองเดียวกันการปลดปล่อย แอมโมเนียออกจากกรดอะมิโน และโปรตีนเป็นสาเหตุทำให้ pH เพิ่มขึ้น มีรายงานว่าถ้า pH ลดลง มากอาจเป็นสาเหตุทำให้มีการเจริญเติบโตต่ำลง นอกจากนี้ความเป็นกรดในสารอาหารยังเกิดได้ เมื่อราใช้คาร์โบไฮเดรตแล้วได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดออกมา การใช้ casamino acid, peptone, yeast extract และแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่า pH จะลดลงเล็กน้อยเมื่อมีการเจริญมากขึ้น

การใช้แหล่งของไนโตรเจนที่แตกต่างกันในสารอาหารของราให้ผลให้ pH สุดท้ายของสารอาหาร แตกต่างกันได้ ส่วนใหญ่แล้วถ้าแหล่งของไนโตรเจนเป็นเกลือแอมโมเนีย เช่นแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อ มีการใช้แอมโมเนียออกไปแล้ว อนุผลิตภัณฑ์ที่เหลือมีผลทำให้สารอาหารมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น แต่ถ้า แหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรต เมื่อราใช้แหล่งของไนโตรเจนไป ทำให้สารอาหารมีความเป็นด่าง มากกว่าเดิม

2.7.4 ผลของความชื้นต่อการเจริญเติบโตของราแมลง

ความชื้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของราแมลง การเกิดสปอร์ และการ งอกของสปอร์ กลุ่มราแมลงส่วนใหญ่ต้องการความชื้นสูง เนื่องจากแมลงอาศัย (host) ส่วนใหญ่อาศัย อยู่ในดินซึ่งถูกปิดจากอากาศภายนอก ดังนั้นเมื่อนำรามาล้างในห้องทดลองจึงต้องควบคุมความชื้น การงอกของสปอร์ของในถังเช่าเกิดได้ดีที่มีความชื้นร้อยละ 85-95

2.7.5 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของราแมลง

แสงสว่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยให้เชื้อราสร้างดอกเห็ด (Fruiting bodies) สำหรับระยะออก ดอกแสงจะช่วยกระตุ้นการสร้างตุ่มดอกเห็ด (primordia) และการเจริญเติบโตของดอกเห็ดแต่ส่งผล ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย ถ้าแสงน้อยเส้นใยจะเจริญเติบโตได้เร็วในสภาพธรรมชาติพบว่าแสง

แดดเป็นตัวกระตุ้นการสร้างสปอร์ และมีผลต่อความอยู่รอดของสปอร์ ถ้าแสงมีความเข้มมากทำให้สปอร์เสียหายเร็ว ระยะเวลาในการได้รับแสงมีความสำคัญต่อการเจริญของ ราแมลงหลายชนิด พบว่ามีผลต่อการเจริญของสโตรมา (stroma) และการจัดเรียงตัวของ perithecium ของรา *Cordyceps sinensis* พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการได้รับแสงและความเข้มแสงทำให้อัตราการเจริญต่ำลง มีผลต่อการเกิดและอยู่รอดของสปอร์ *Zoophthora radicans* โดยพบว่าการปลดปล่อยสปอร์เมื่อได้รับแสง เช่นเดียวกับในธรรมชาติที่พบการปลดปล่อยสปอร์ในตอนเช้ามีด

แสงช่วงที่ตามองเห็นหรืออัลตราไวโอเล็ต มีผลต่อการเกิดสปอร์และการเพิ่มความยาวของ conidia ในราแมลงหลายชนิด ระยะเวลาในการได้รับแสงมีผลต่อการงอกของสปอร์ของ *E. aphid* เป็นต้น ในระยะแรกของการงอกสปอร์ของ *E. grylli* ต้องการปริมาณแสงที่มีความเหมาะสม (4000 ลักซ์) สำหรับการงอกสูงสุดของสปอร์ แสงเพิ่มอัตราการงอกของสปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว เมื่อทิ้งไว้ในที่มี fluorescent white light ที่ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-24 ชั่วโมง ร้อยละการงอกของสปอร์จะสูงที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็น aerobic แต่ในสภาวะ anaerobic พบว่าสปอร์ไม่มีการงอก ทั้งนี้การที่ราเจริญเติบโตในช่วงแสงที่แตกต่างกันจะทำให้มีการสังเคราะห์สารแตกต่างกัน มิงานวิจัยที่ยืนยันได้ว่า สีของแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่า และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นกัน

2.7.6 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของราแมลง

อุณหภูมามีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของราแมลง ทั้งระยะเจริญเติบโตของเส้นใย การออกดอกและการปล่อยสปอร์ การเพิ่มอุณหภูมิมิผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมทางชีวเคมีเพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่อุณหภูมิเหมาะสม (optimum temperature) อุณหภูมิยังมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของการสังเคราะห์วิตามิน กรดอะมิโนหรือสารเมแทบอไลต์อื่นๆ ปกติช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมจะเป็นช่วงแคบๆ อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์บอนให้เป็นเซลล์องค์ประกอบของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ โดยเฉพาะ RNA จะขึ้นกับอุณหภูมิเช่นเดียวอัตราการเจริญเติบโต อิทธิพลของอุณหภูมิต่อองค์ประกอบของ RNA มีผลโดยตรงต่ออัตราการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งอัตราการสังเคราะห์โปรตีนก็สนับสนุนอัตราการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน

2.7.7 เอกสารที่เกี่ยวข้องของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของราแมลง

Yamanaka (1998) พบว่าการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดเมื่อให้แสงส่องสว่างที่มีความเข้มสูงอย่างต่อเนื่องที่ 2.93 วัตต์ต่อตารางเมตร ทำให้มีผลมีผลยับยั้งการยึดตัวของดอกเห็ด และการใช้แสงที่มีความเข้มต่ำที่ 0.088 วัตต์ต่อตารางเมตร ยับยั้งการแตกแขนงของดอกเห็ดเล็กน้อย

Smith *et al.*, (1981) อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญของการเจริญเติบโตของราแมลง อุณหภูมิที่แตกต่างกันทำให้ระยะเวลาในการงอกของสปอร์ของรา *Beauveria bassiana* ต่างกัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการงอก 4.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการงอก 5.3 ชั่วโมง

Ben (2000) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารแบบเหลวของเชื้อรา *Paecilomyces japonica* พบว่า แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่ดีที่สุดคือ มอลโทส สารสกัดยีสต์ และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต ตามลำดับโดยควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้น 5.0 อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที

Ping *et al.*, (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างเส้นใย ในอาหารแบบเหลวของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* C240 โดยการใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุที่ดีที่สุดคือ กลูโคส, KNO_3 , K_2HPO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ตามลำดับ โดยใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ pH 6.0 สำหรับความเข้มข้นเท่ากับ 4, 0.6, 0.1 และ 0.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลได้ของเส้นใยมากที่สุดคือ 10.18 กรัมต่อลิตร

Park *et al.*, (2001) ทำการทดสอบประสิทธิภาพสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps militaris* ในอาหารแบบเหลวทำการทดลองในพลาสติกโดยใช้เชื้อตั้งต้นร้อยละ 4 พบว่า แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร และ Corn steep powder 10 กรัมต่อลิตร สามารถสร้างเส้นใยเชื้อราได้ 12.75 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ในปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร

Yin *et al.*, (2001) ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps sinensis* ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 30 กรัม เปปโตเน 15 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต 1.73 กรัม และมันฝรั่ง 200 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ได้เส้นใยชีวมวลเท่ากับ 25.0 กรัมต่อลิตร โดยผลของพารามิเตอร์ ความเร็วรอบ ในการเขย่า 100, 150, 200 รอบต่อนาที มีผลต่อการเจริญของเส้นใย ซึ่งเป็นตัวแปรสำคัญต่อสารตั้งต้น ความร้อน และออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และจะเพิ่มแรงเชียร์ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา และผลต่อการผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ เส้นใยของ *Cordyceps sinensis* เพิ่มขึ้น จากการเพิ่มความเร็วยรอบในการเขย่า แต่พบว่าผลผลิตของเส้นใยจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งอาจเกิดจากผลเชิงลบของแรงเชียร์ที่เพิ่มขึ้นต่อกลุ่มของเส้นใย

Dong and Yao (2005) ได้ศึกษาถึงความต้องการทางโภชนาการของ *Cordyceps sinensis* ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์โบไฮเดรต 17 ชนิด สารประกอบไนโตรเจน 16 ชนิด วิตามิน 9 ชนิด แร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง อย่างละ 4 ชนิด และ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 8 อัตราส่วน โดยใช้ one-factor-at-a-time และ orthogonal matrix methods พบว่าซูโครส เปปโตเน กรดโพลีลิก แคลเซียม สังกะสี และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน 12:1 มีการเจริญเติบโตของเส้นใยที่เหมาะสม ความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครส เปปโตเน และยีสต์สกัด สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อราคือ 50, 10 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Jo *et al.* (2005) ศึกษาผลของการใช้แสงเพื่อผลิตสารคอร์ไดเซปินของ *Cordyceps militaris* ในอาหารเหลว YMG โดยใช้ความเข้มแสง 1000 ลักซ์ พบว่ามีการผลิตสารคอร์ไดเซปินเท่ากับ 51.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้กล่าวว่าการผลิตสารคอร์ไดเซปินในสภาวะที่ใช้แสงจะดีกว่าในสภาวะที่ไม่ใช้

แสงแต่อย่างไรก็ตามการผลิตสารคอร์ไดเซปินได้มากที่สุดใ้สภาวะที่ใช้แสงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นปริมาณของสารคอร์ไดเซปินจะลดลง

Mao *et al.*, (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปิน โดยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลวของ *Cordyceps militaris* พบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตคอร์ไดเซปิน ในขณะที่เส้นใยเจริญเติบโตดีที่สุดใ้สภาวะอาหารที่มีกาแลคโตส น้ำหนักเส้นใยแห้ง (DW) เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 25-70 กรัมต่อลิตร การผลิตคอร์ไดเซปินความเข้มข้นสูงสุดคือ 245.7 ± 4.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ของวันที่ 18 ได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้ศึกษาโดยใช้การออกแบบส่วนประสมกลางและการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง การผลิตคอร์ไดเซปินสูงสุดและผลผลิตเฉลี่ยอยู่ที่ 345.4 ± 8.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 19.2 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวันโดยชนิดและอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือ กลูโคส 42.0 กรัมต่อลิตร และ เปปโติน 15.8 กรัมต่อลิตร

Cha *et al.*, (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารอาหารในการเจริญของเส้นใยถึงเข้า โดยทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารเหลว 50 มิลลิลิตรประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของซูโครส ร้อยละ 2 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.9 K_2HPO_4 ร้อยละ 0.3 และ $CaCl_2$ ร้อยละ 0.4 สามารถให้เส้นใยสูงสุด 54 กรัมต่อลิตร

Hung *et al.*, (2009) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารคอร์ไดเซปิน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตคอร์ไดเซปิน อยู่ที่ 15 ถึง 20 องศาเซลเซียสและ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตคอร์ไดเซปินหยุดลง

Dong *et al.*, (2012) พบว่าในการใช้แสงสีที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตดอกเห็ดและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน โดยทำการศึกษากับแสงสีชมพูอ่อน ความยาวคลื่น 450–460 นาโนเมตร ร่วมกับความยาวคลื่น 620–630 นาโนเมตร แสงสีน้ำเงิน ความยาวคลื่น 450–460 นาโนเมตร แสงสีขาว และแสงสีแดง ความยาวคลื่น 620–630 นาโนเมตร พบว่าแสงสีชมพูสามารรถเพิ่มน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดได้ดีที่สุดร้อยละ 6.77 รวมถึงมีผลต่อการสะสมของสารแคโรทีนอยด์ และสารคอร์ไดเซปินดีที่สุด สำหรับการเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีแดงมีผลต่อการผลิตสารอะดีโนซีนได้เป็นอย่างดี

Li *et al.*, (2014) ได้ศึกษาอิทธิพลของแสงจากหลอดไฟ LED ต่อการเจริญของดอกเห็ดและการสร้างสารคอร์ไดเซปินของ *Cordyceps militaris* พบว่าการทำงานของควมยาวคลื่นแสงที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การใช้แสงจากหลอดไฟ LED แทนหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) สามารถเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ดถึงร้อยละ 62 และปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่เพิ่มขึ้น โดยแสงสีแดงต่อแสงสีน้ำเงิน อัตราส่วน 2:1 และ ร้อยละ 10 ของแสง far-red เป็นช่วงแสงที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทอง

Tuli *et al.*, (2014) ทำการศึกษาสภาวะทางกายภาพและทางโภชนาการที่เหมาะสมต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปิน โดยทำการทดสอบที่ละตัวแปรในแต่ละครั้ง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารคอร์ไดเซปิน อยู่ในช่วง pH 5.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 8 ปริมาตรต่อปริมาตร อายุของหัวเชื้อเพาะเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ เดกซ์โทรส 15 กรัม ยีสต์สกัด 8 กรัม ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 30 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 0.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

Lan *et al.*, (2015) ศึกษาความเหมาะสมของค่าพารามิเตอร์ ในการผลิตเส้นใยของ *Cordyceps sinensis* UM01 ในอาหารเหลว ได้แก่ pH เริ่มต้น อุณหภูมิ ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาตรของหัวเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 15 องศาเซลเซียส โดยค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที และปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (สัดส่วนของปริมาตรของอาหารต่อปริมาตรของขวดที่ใช้เพาะเลี้ยง) 2/5 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 3

Zhen *et al.*, (2016) ศึกษาความเหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *Cordyceps gunnii* และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการต้านเนื้องอก พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใย กว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้น้ำแป้ง และกลูโคสในการเพาะเลี้ยง ได้ค่าผลได้ของเส้นใยแห้งสูงสุดคือ 14.98 ± 0.43 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้สูงสุดเท่ากับ 93.00 ± 6.84 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ส่วนน้ำแป้ง ให้ค่าผลได้ของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำที่สุด สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยคือ ยีสต์สกัด ให้ค่าผลได้มากที่สุดเท่ากับ 12.37 ± 0.46 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อการใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจน และเปปโตเนสามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดที่ 98.87 ± 4.77 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Zhen *et al.*, (2016) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสที่ต่างกัน คือ ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5. และ 5.0 กรัมต่อปริมาตร ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Cordyceps gunnii* ในสภาวะอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 2.0 กรัมต่อปริมาตร ให้ค่าผลได้ของเส้นใยแห้งมากที่สุดที่ 15.94 ± 1.26 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แต่กลับให้ค่าผลได้ของพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณที่ต่ำ แต่เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็นร้อยละ 4.5 กรัมต่อปริมาตร พบค่าผลได้ของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นสูงถึง 138.78 ± 3.89 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลกระทบต่อค่าผลได้ของน้ำหนักเส้นใยแห้งและการผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Cordyceps gunnii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การเพาะเลี้ยงถั่วงอกและวัตถุดิบทางธรรมชาติสำหรับการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงถั่วงอกในห้องปฏิบัติการมีหลายรูปแบบ กระบวนการเพาะเลี้ยงถั่วงอกโดยการหมักในอาหารแบบเหลว (Submerged liquid fermentation) (Dong and Yao. 2005) และการเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง (Solid state fermentation) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการผลิตถั่วงอกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ในการผลิตเชิงพาณิชย์ของถั่วงอกมักจะผลิตบนอาหารแบบแข็งมากกว่า อย่างเช่นการใช้ธัญพืช เช่น ข้าวกล้อง ข้าวฟ่าง ลูกเดือย ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ และข้าวเหนียวเป็นวัสดุปลูก (Basith and Madelin. 1968; Sung. 1999; Li *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014). โดยมีงานวิจัยของ Kobayasi (1998) แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า สามารถใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงถั่วงอกเพื่อผลิตดอกเห็ดและสารสำคัญได้ โดยทั่วไปการผลิตดอกเห็ดของถั่วงอกบนผิวหน้าอาหารแข็งที่ใช้ธัญพืชเป็นวัสดุปลูกมี 3 ระยะ คือ ระยะการเจริญของเส้นใย ระยะการเกิดตาดอก (primordial initiation stage) และระยะการเจริญเป็นดอกเห็ด (Liang *et al.*, 2014)

นักวิจัยได้เริ่มทำการวิจัยพัฒนาการเพาะเลี้ยงเห็ดในสกุลคอร์โดเซพบนอาหารเทียมเพื่อหาวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงทดแทนแมลงอาศัย การทดลองในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะใช้ดักแด้ไหม หรือตัวอ่อนหนอน ในสกุล *Bombyx mori* (Hong *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2011) ต่อมาเริ่มมีการวิจัยใช้วัตถุดิบจากธัญพืชเป็นสับสเตรท ผสมกับธาตุอาหารต่างๆ และทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงที่ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ข้อมูลในตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบทางเคมีของข้าวที่มีสี

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของข้าว

ข้าว	โปรตีน (กรัม/100กรัม)	เหล็ก (มิลลิกรัม/100กรัม)	สังกะสี (มิลลิกรัม/100กรัม)	เส้นใย (กรัม/100กรัม)
ข้าวขาวขัดสี	6.8	1.2	0.5	0.6
ข้าวสีน้ำตาล	7.9	2.2	0.5	2.8
ข้าวสีแดง	7.0	5.5	3.3	2.0
ข้าวสีม่วง	8.3	3.9	2.2	1.4
ข้าวสีดำ	8.5	3.5	-	4.9

ที่มา: ประสิทธิ์ วังภคพัฒน์วงศ์ (2553)

2.8.1 ธัญพืชที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง

ข้าวสีมีคุณค่าทางอาหารและยามากกว่าข้าวขาว เพราะพบว่าทั้งสีดำ สีแดง สีม่วงเหล่านี้เกิดจากสารให้สีที่มีชื่อว่าแอนโทไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ช่วยในการหมุนเวียนของกระแสโลหิต และชะลอความเสื่อมโดยเฉพาะข้าวสีเข้ม มีสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงโรคมะเร็งได้ ตารางที่ 2.5 และ 2.6 แสดงโภชนาการของข้าวและของวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

2.8.1.1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่

ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือกและพัฒนาจากข้าวเจ้าหอมนิล (พันธุ์พ่อ) กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 สถาบันวิจัยข้าว (พันธุ์แม่) ลักษณะประจำพันธุ์ ความสูงประมาณ 106 เซนติเมตร อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 130 วัน ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นข้าวที่มีสีม่วงเข้ม คล้ายกับสีของข้าวเหนียวดำ แต่จะร่วนกว่า รูปร่างเมล็ดเรียวยาว เมล็ดข้าวเมื่อหุงแล้วจะมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว มีความนุ่มนวลและยืดหยุ่นได้ไม่จำกัด สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ข้าวไรซ์เบอร์รี่มีธาตุเหล็กและสารต้านอนุมูลอิสระสูง มีใยอาหารที่อยู่ในรำข้าวสูงจึงช่วยชะลอการดูดซึมน้ำตาล ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดขึ้นช้ากว่าการบริโภคข้าวกล้องและข้าวขาวขัดทั่วไป มีสรรพคุณช่วยลดระดับไขมันและคอเลสเตอรอล นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และมหาวิทยาลัยมหิดลได้ร่วมกันศึกษาผลของการรับประทานข้าวไรซ์เบอร์รี่ ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน พบว่าสามารถช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีขึ้น เนื่องจากข้าวไรซ์เบอร์รี่มีดัชนีน้ำตาล ต่ำกว่าข้าวขัดสีพันธุ์เดียวกัน การทานอาหารที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำจะช่วยให้ เซลล์ร่างกายใช้อินซูลินได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นเซลล์จะรับน้ำตาลในเลือดไปใช้เป็นพลังงานได้มากขึ้นทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำลง มีราคาประมาณกิโลกรัมละ 100-150 บาท

2.8.1.2 ข้าวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดพัทลุง มีลักษณะแตกต่างจากพันธุ์ข้าวทั่วไป โดยปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้ง มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปนแดงอ่อนๆ ถึงแดงเข้ม เมล็ดเล็กเรียวยาวทำงอน มีขนาดยาว 6.70 มิลลิเมตร กว้าง 1.18 มิลลิเมตร หนา 1.64 มิลลิเมตร สามารถต้านทานต่อโรค แมลง และศัตรูพืช รวมทั้งปรับตัวกับสิ่งแวดล้อมได้ดี นิยมรับประทานแบบข้าวกล้อง ข้าวซ้อมมือ เมื่อหุงสุกเมล็ดข้าวจะนุ่ม มีความคงตัวของเมล็ดข้าวสูง คุณค่าโภชนาการอาหาร แสดงในตารางที่ 2.3 นอกจากนี้ยังมีกากใยอาหาร ธาตุเหล็ก และฟอสฟอรัสที่สูง จึงมีประโยชน์ในการบำรุงโลหิต ชะลอความแก่ ป้องกันโรคความจำเสื่อม และยังมีสารแอนติออกซิแดนซ์ พวก oryzanol เป็นกลุ่มวิตามินอี ในกลุ่มโทโคฟีรอล กลุ่มโทโคไตรอีนอล และสารแกมมา-โอริซานอล (Gamma Oryzanol) เป็นสารที่พบในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวเท่านั้น และมี Gamma Amino Butyric Acid (GABA) ช่วยลดอัตราเสี่ยงการเป็นมะเร็ง (ศูนย์พันธุ์ข้าวพัทลุง, 2553) มีราคาประมาณกิโลกรัมละ 95-120 บาท

2.8.1.3 ข้าวหอมนิล

ข้าวหอมนิลมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งยังมีข้อดีทางด้านคุณภาพทางกายภาพทางเคมี และคุณภาพการหุงต้มรับประทานดี คือ เป็นข้าวเมล็ดเรียวยาว เเปอร์เซ็นต์อะมิโลสต่ำ ข้าวสุกเหนียวนุ่ม และมีกลิ่นหอม จากการตรวจวิเคราะห์ในเมล็ดพบว่า มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง ประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิก และแอนโทไซยานิน ที่มีผลทำให้ผิวหนังของเราไม่เหี่ยวแห้งเร็วก่อนวัยอันควร แลมยังช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งและ ยังออกฤทธิ์ในการขยายเส้นเลือด ช่วยลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ เส้นเลือดอุดตันใน สมองและโรคอัมพาตอีกด้วย ราคาประมาณกิโลกรัมละ 100-120 บาท

2.8.1.4 ข้าวมันปู

ข้าวมันปูเป็นข้าวพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเปลือกข้าวเป็นสีแดงแบบมันปู มีไขมันและสารอาหารสูงกว่าข้าวขัดสี ซึ่งประกอบไปด้วยแป้ง ไขมัน โปรตีน ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กในปริมาณสูง ทองแดง วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี สรรพคุณ ป้องกันโรคหัวใจป้องกันโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงรักษาอาการมือเท้าบวม รักษากระเพาะอาหารที่ไม่ปกติและเป็นอาหารที่เพิ่มเลือดที่ดีมากสำหรับผู้หญิงที่เป็นโรคโลหิตจาง (กรมการข้าว. 2556) ราคาประมาณกิโลกรัมละ 70-100 บาท

2.8.1.5 ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว

ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว เป็นข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวกล้องสีดำ ไวต่อช่วงแสง เก็บเกี่ยวประมาณกลางเดือนตุลาคม เมล็ดข้าวเหนียวดำลิ้มผัวมีสารสำคัญชื่อ แกมมา-โอไรซานอล (gamma oryzanol) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) สามารถลดคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่มระดับของ high density lipoprotein (HDL) ในเลือด มีผลต่อการทำงานของต่อมไธสมอง ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารและการรวมตัวของเกล็ดเลือดลดน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับของฮอร์โมนอินซูลิน ของคนเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยการหมุนเวียนของกระแสโลหิต ชะลอการเสื่อมของเซลล์ร่างกาย (พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์, 2551) และที่สำคัญมีผลจากการวิเคราะห์ว่าเครื่องดื่มที่ทำจากข้าวลิ้มผัว พบว่าที่ผ่านความร้อนโดยการต้มเดือด มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นส่วนปริมาณวิตามินบี 1 ที่อยู่ในข้าวลิ้มผัวจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ในเมล็ดข้าวเหนียวดำที่มีเยื่อหุ้มเมล็ด สีเข้ม ได้แก่ โปรตีน ซึ่งในข้าวกล้องมีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ ไลซีน (lysine) สูงกว่าข้าวสาร (ผาณิต และคณะ, 2555) วิตามินบางชนิดในเมล็ดข้าว เป็นสารอาหารที่ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้แต่มีความสำคัญช่วยให้ร่างกายทำงานเป็นปกติ เช่น วิตามินเอ ช่วยในการเจริญเติบโต บำรุงสายตาและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ช่วยพัฒนากระดูกและฟัน และช่วยสร้างภูมิคุ้มกันโรค วิตามินอี (tocopherol) ช่วยชะลอการแก่ของเซลล์ ให้การกระจายออกซิเจนในกระแสเลือดดีขึ้น ป้องกันการสะสมและการเกาะของแคลเซียมในหลอดเลือด วิตามินบี1 (thiamine) เป็นสารอาหารที่มีบทบาทใน กลไกการย่อยคาร์โบไฮเดรตในร่างกายให้ดีขึ้น ทำให้ร่างกายรับอาหารได้มากขึ้น ช่วยสนับสนุนระบบการทำงานของประสาท หัวใจ และกล้ามเนื้อ ราคา กิโลละ 80-160 บาท

ผาณิต และคณะ (2555) ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของข้าว 9 สายพันธุ์ จากจังหวัดอุบลราชธานี คือข้าวเหนียวดำ ข้าวหอมกัญญา ข้าวหอมนิล ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวหอมมะลิ105 ข้าวเจ้าแตก ข้าวสินเหล็ก และข้าวหอมอุบล นำข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์มาศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของข้าว โดยวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น ใย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ใยอาหาร (dietary fiber) กากใย (crude fiber) และพลังงาน ซึ่งข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์มีปริมาณความชื้นและคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน โดยพบว่าข้าวที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุด คือ ข้าวหอมอุบล และข้าวหอมกัญญามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด ข้าวที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด คือ

ข้าวเหนียวดำ และข้าวสีนเหล็กจะมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด ข้าวที่มีปริมาณไขมันมากที่สุด คือ ข้าวหอมกัญญา และข้าวเหนียวดำมีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ปริมาณเถ้าในข้าว พบว่าข้าวสีนเหล็กมีปริมาณเถ้าสูงที่สุด และข้าวเหนียวดำต่ำที่สุด ปริมาณกากใยอาหาร พบว่าข้าวที่มีปริมาณกากใยสูงที่สุด คือ ข้าวหอมมะลิแดง ข้าวที่มีกากใยต่ำที่สุด คือ ข้าวสังข์หยดพัทลุง ปริมาณใยอาหาร พบว่าข้าวที่มีปริมาณใยอาหารสูงที่สุด คือ ข้าวหอมนิลและข้าวที่มีใยอาหารต่ำสุด คือ ข้าวสีนเหล็ก ค่าพลังงานของข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 350.47-361.83 แคลอรีต่อ100 กรัม พบว่าข้าวหอมมะลิให้พลังงานสูงที่สุด ในขณะที่ข้าวสังข์หยดให้พลังงานต่ำที่สุด

จากการวิเคราะห์ปริมาณไนอะซินหรือวิตามินบี3 พบว่าข้าวหอมนิลมีปริมาณไนอะซินสูงที่สุด รายงานการวิจัย ข้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง และสีม่วงเข้ม มีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าข้าวที่มีเยื่อหุ้มสีปกติ ในการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของข้าวสีต่างๆ พบว่ามีสารอาหารอยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพพะหรือจมูกข้าว (Embryo) อยู่หลายชนิด โดยพบสารประกอบโพลีฟีนอลิก (polyphenolic compounds) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ส่วนสารสีแดง สีม่วง ที่ทำให้เมล็ดมีสีนั้นเป็นสารแอนโทไซยานินในกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพพะของข้าว มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเหมือนกัน สารอื่นที่เป็นประโยชน์ คือไขมันไม่อิ่มตัว เช่นโอเมก้า 3 โอเมก้า 6 และโอเมก้า 9 เป็นไขมันที่มีประโยชน์ วิตามินอี (tocopherol) มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองละลายได้ดีในไขมัน ช่วยชะลอความแก่ของเซลล์ ทั้งนี้มีการเปรียบเทียบผลของการบริโภคข้าวขาวและข้าวมีสีในกระต่าย พบว่าภาวะการอุดตันของไขมันในเส้นเลือดของกระต่ายที่กินข้าวแดงมีค่าน้อยกว่ากระต่ายที่กินข้าวขัดขาวถึงร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังพบว่าระดับของ reactive oxygen species และ malondialdehyde (ผลผลิตของการเกิด lipid peroxidation) ที่อยู่ในตับของกระต่ายที่กินข้าวแดงมีการสะสมในปริมาณน้อย ในขณะที่เดียวกันมีกิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase เพิ่มสูงขึ้น และยังพบว่าข้าวแดงยังช่วยให้มีการสะสมของ DHL ซึ่งเป็นคลอเลสเทอรอลชนิดที่เป็นประโยชน์ (วาริช ศรีละออง, 2549)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 2.6 ลักษณะของเมล็ดข้าวที่นำมาทดลอง ก) ข้าวหอมนิล ข) ข้าวมันปู ค) ข้าวไรซ์เบอร์รี่
 ง) ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว จ) ข้าวสังข์หยด

ที่มา: ศันสนีย์ (2561)

2.8.2 แหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติ

2.8.2.1 ไข่ไก่

ไข่ไก่เป็นแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติ ให้กรดอะมิโนจำเป็นทุกชนิด ตลอดจนวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด เรตินอล (วิตามินเอ) ช่วยในการมองเห็นและระบบภูมิคุ้มกัน ไบโอฟลาวิน (วิตามินบี2) เกี่ยวกับเซลล์เม็ดเลือดแดง การมองเห็นและระบบประสาท โคลีน (choline) ช่วยในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน กรดโฟลิก (วิตามินบี9) วิตามินบี6 วิตามินบี12 เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม วิตามินเอ ดีและอี คุณค่าทางโภชนาการของไข่ไก่ แสดงดังตารางที่ 2.4 ไข่แดงขนาดใหญ่ให้พลังงานประมาณ 60 แคลอรี (250 กิโลจูล) ไข่ขาวให้พลังงานประมาณ 15 แคลอรี (60 กิโลจูล) ไข่แดงขนาดใหญ่มี ปริมาณคอเลสเตอรอลที่แนะนำให้รับประทานต่อวันที่ 300 มิลลิกรัม ไข่แดงมีน้ำหนัก คิดเป็นร้อยละ 33 ของน้ำหนักของเหลวของไข่ ไขมันทั้งหมดอยู่ในไข่แดง

2.8.2.2 กากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืช ได้จากการนำถั่วเหลืองไปสกัด น้ำมันออก กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุด มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายตัว แต่มีซิสเทอีน และเมไทโอนีนในระดับต่ำ เม็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณร้อยละ 38 ไขมันร้อยละ 16-21 แต่เมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ยร้อยละ 50 ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดน้ำมันและขนาดของเมล็ด ถั่วเหลืองดิบมีตัวยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ซึ่งจะขัดขวางการย่อยโปรตีนของน้ำย่อยทริปซิน พบว่าถั่วเหลืองที่โดนความร้อนจะมีคุณค่าของโภชนะสูงกว่าถั่วเหลืองดิบ แต่หากความร้อนที่ให้สูงเกินไปจะทำให้คุณค่าของโภชนะเสียได้โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์ได้ของไลซีน และอาร์จินีนลดลง องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลืองแยกเปลือก แสดงดังตารางที่ 2.7

2.8.3 แหล่งแร่ธาตุจากธรรมชาติ

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต แร่ธาตุก็เป็นส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเช่นกัน แร่ธาตุหรือเกลือแร่ เป็นสารอนินทรีย์และเป็นสารอาหารที่จำเป็นในการเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกาย มีบทบาทและหน้าที่สำคัญหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย เป็นองค์ประกอบของเซลล์เนื้อเยื่อและเส้นประสาท เอนไซม์ ฮอร์โมน และวิตามิน นอกจากนี้ แร่ธาตุยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อในทุกอวัยวะ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

แร่ธาตุหลัก (Macro minerals) เป็นแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการปริมาณมาก เป็นแร่ธาตุที่ร่างกายมีความต้องการในหนึ่งวันมากกว่า 100 mg ขึ้นไป ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกเนเซียม โซเดียม กำมะถัน และคลอไรด์

แร่ธาตุรอง (Trace minerals) คือ แร่ธาตุที่ร่างกายต้องการในปริมาณน้อย เป็นแร่ธาตุที่ร่างกายมีความต้องการในหนึ่งวันในปริมาณน้อยกว่า 100 mg ต่อวัน แต่ถึงแม้ร่างกายจะต้องการแร่ธาตุประเภทนี้ในปริมาณน้อย ก็เชื่อว่าจะไม่มีความสำคัญ ซึ่งแร่ธาตุในกลุ่มนี้ได้แก่ เหล็ก (Iron), สังกะสี

(Zinc), ซีลีเนียม (Selenium), แมงกานีส (Manganese), ทองแดง (Copper), ไอโอดีน (Iodine), โครเมียม (Chromium), โคบอลต์ (Cobalt), ฟลูออไรด์ (Fluoride), โมลิบดีนัม (molybdenum) และ วานาเดียม (Vanadium)

2.8.3.1 โพแทสเซียม (K)

โพแทสเซียมไม่ได้เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ในพืช แต่มีหน้าที่เกี่ยวกับการทำงานด้านสรีรวิทยาของพืช เป็นแร่ธาตุจำเป็นในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและการเคลื่อนย้ายแป้งและน้ำตาล นอกจากนี้โพแทสเซียมยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ในพืชผักรับประทานต้นและใบมีความต้องการโพแทสเซียมไม่น้อยกว่าไนโตรเจน เพราะเป็นธาตุที่ช่วยส่งเสริมคุณภาพ เช่น ช่วยให้ผักเพิ่มเนื้อและน้ำหนักรับประทานได้ดี และเป็นเงาเข้ารับประทาน ส่วนผักต่างๆ ที่รับประทานใบถ้าได้รับโพแทสเซียมเพียงพอจะไม่เฉาตายเมื่อตัดส่งตลาด จึงสดอยู่ได้นาน ในพืชผักกินผลเช่นมะเขือเทศ ความต้องการโพแทสเซียมจะสูงในช่วงที่มีการพัฒนาของผล รูปของโพแทสเซียมที่พืชนำไปใช้ได้คือ โพแทสเซียมไอออน (K+) แต่ถ้ามีโพแทสเซียมมากเกินไปจะรบกวนการนำแคลเซียมและแมกนีเซียมไปใช้ สารเคมีที่ให้โพแทสเซียมมีอยู่หลายตัวเช่น โพแทสเซียมไนเตรต และโพแทสเซียมฟอสเฟต แหล่งที่พบของแร่ธาตุโพแทสเซียมจากธรรมชาติ เช่น

1. มะพร้าว

มะพร้าวเป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลปาล์ม สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย แต่จะนิยมปลูกบริเวณทางภาคใต้เป็นส่วนมาก นำมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่ลำต้น ลูกมะพร้าว ใบมะพร้าว ยอดมะพร้าว และน้ำมะพร้าว ผลมะพร้าวจะเริ่มแก่เมื่ออายุประมาณ 11 เดือน จนอายุ 12 เดือนก็จะแก่เต็มที่หลังจากออกผล สำหรับมะพร้าวอ่อนอายุประมาณ 4-5 เดือน จะนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่มซึ่งจะมีรสชาติหวานหอมไม่เปรี้ยว มีน้ำบรรจุอยู่ในผลประมาณร้อยละ 90 ซึ่งมีปริมาณของน้ำต่อผลอยู่ในช่วง 400-465 ซีซี ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวเป็นเครื่องดื่มช่วยดับกระหาย และมีสรรพคุณทางยา คือ สามารถเป็นเครื่องดื่มเกลือแร่ เนื่องจากอุดมไปด้วยโพแทสเซียมสูงถึง 250-300 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ทั้งนี้เมื่อดื่มน้ำมะพร้าวอ่อนหนึ่งผลจะทำให้ร่างกายได้รับปริมาณของวิตามินบี และวิตามินซีที่พอเพียงกับความต้องการของร่างกายต่อวันได้โดยไม่ต้องเพิ่มจากแหล่งอื่น ประโยชน์ในด้านการเจริญเติบโตของพืช น้ำมะพร้าวสามารถกระตุ้นเซลล์ให้เซลล์เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อน้ำมะพร้าวจากผลที่ยังไม่แก่พบว่ามีประสิทธิภาพได้ดีกว่าผลที่แก่แล้ว (อภิญาณ์ คู่ชูชีพ, 2554)

2. กล้วย

กล้วยเป็นผลไม้เมืองร้อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ กล้วยที่ปลูกเป็นการค้าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ได้แก่ กล้วยหอม กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว่า (วรรณภา และคณะ, 2551) โดยเฉพาะกล้วยน้ำว่าเป็นที่นิยมปลูกในประเทศไทย เนื่องจากคงความสดอยู่ได้หลายวัน และมีคุณค่าทางสารอาหารหลายชนิด ทั้งพลังงาน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และแร่ธาตุ พบว่ามีโพแทสเซียม

ที่สูง ไขมันต่ำและเป็นแหล่งวิตามินและเส้นใยที่ดี และที่สำคัญเป็นผลไม้ที่มีตลอดทั้งปี ในประเทศไทย กล้วยน้ำว้าปลูกกันมากที่สุดในจังหวัดเลย หนองคาย และระนอง ตามลำดับ มีงานวิจัยการใช้ประโยชน์กล้วยมาผสมในอาหารเพื่อเพิ่มการผลิต งานวิจัยของ ธนากรและดวงใจ (2559) ทดลองใช้กล้วยหอมสุกผสมในสูตรอาหารเลี้ยงปลาชนิด ร้อยละ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ พบว่าปลาชนิดมีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ แตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($p < 0.05$) กับชุดควบคุม โดยปลาชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมกล้วยร้อยละ 10 มีน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยมากที่สุด เท่ากับ 364.41 กรัม และค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุด เท่ากับ 1.12

3. ฟักทอง

ฟักทองเป็นพืชล้มลุกจัดเป็นพืชในตระกูลแตง ฟักทองแบ่งออกเป็นสองตระกูล คือ ตระกูลฟักทองอเมริกัน (sumpkin) จะมีผลใหญ่ เนื้อนุ่ม และอีกตระกูลคือตระกูลสควอช (squash) ซึ่งได้แก่ฟักทองไทยและฟักทองญี่ปุ่น โดยฟักทองไทยนั้น ผิวของผลขณะยังอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีเหลืองสลับเขียว ผิวขรุขระเล็กน้อยโดยเปลือกจะมีลักษณะแข็งเนื้อในมีสีเหลือง เมื่อแก่เนื้อจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นจากสารสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ประกอบด้วยบีต้าแคโรทีน แอลฟาแคโรทีน และลูทีน เป็นต้น สรรพคุณและคุณค่าทางอาหารเนื้อฟักทอง มีวิตามินเอสูง เป็นวิตามินที่ละลายได้ในไขมัน ช่วยในการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายหลายระบบ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยังมีส่วนประกอบของ ธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม ธาตุแมงกานีส ธาตุเหล็ก ซิงค์ วิตามินซี วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินบี3 วิตามินบี5 วิตามินบี6 และแบง เป็นต้น โดยเฉพาะ บีต้าแคโรทีนสามารถช่วยลดการเกิดมะเร็ง โดยมีเอนไซม์ที่สามารถสลายสารไนโตรซามีน โดยเข้าไปทำลายบทบาทของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง ส่งผลให้ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งในระบบย่อยอาหารได้ทันความชรา บรรเทาอาการปวดเมื่อยของข้อเข่าได้

ตารางที่ 2.5 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาต่อวัตถุดิบ 100 กรัม

คุณค่าทางโภชนาการ	ชนิดของข้าว				
	ข้าวไรซ์เบอร์รี่	ข้าวสังข์หยด	ข้าวหอมมะลิ	ข้าวมันญี่ปุ่น	ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	330	366	360	347	-
โปรตีน (กรัม)	18	8.3	6	5.8	10.63
ไขมัน (กรัม)	8	-	1	2.9	-
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	46	80	81	72.5	-
ใยอาหาร (กรัม)	-	0.9	2	4.0	-
วิตามิน					
วิตามินบี 1 (มก.)	0.042	0.18	-	0.44	-
วิตามินบี 2 (มก.)	-	0.06	-	0.18	-
วิตามินอี (มก.)	0.067	-	-	-	1.683
ไนอาซิน (B3) (มก.)	-	3.97	-	2.14	-

ตารางที่ 2.5 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาต่อวัตถุดิบ 100 กรัม (ต่อ)

คุณค่าทาง โภชนาการ	ชนิดของข้าว				
	ข้าวไรซ์ เบอร์รี่	ข้าวสังข์หยด	ข้าวหอมนิล	ข้าวมันปู	ข้าวเหนียว ดำลิ้มผิว
แทนนิน (มก.)	89.33	-	-	-	-
แกมมาโอไรซานอล(µg)	462	-	-	-	50.81
โอเมก้า 3 (มก.)	25.51	-	-	-	33.94
โอเมก้า 6 (มก.)	-	-	-	-	1,160.08
โอเมก้า 9 (มก.)	-	-	-	-	1,140.41
แอนโทไซยานิน (มก.)	250.36	-	-	-	46.56
เกลือแร่					
โพแทสเซียม (มก.)	-	-	339.4	-	-
แคลเซียม (มก.)	-	13	4.2	16	16.97
ฟอสฟอรัส (มก.)	-	165	-	120	-
แมงกานีส (มก.)	-	-	-	-	35.38
เหล็ก (มก.)	13-18	10.52	3.26	-	8.41
สังกะสี (มก.)	31.9	-	2.9	-	2.36

ที่มา: ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวมันปู และ ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว อ้างอิงจากฉลากโภชนาการของข้าวที่ใช้ทดสอบข้างล่างของผลิตภัณฑ์

: ข้าวไรซ์เบอร์รี่ อ้างจาก กรมการข้าว, 2018 และ อภิชาติ, 2550

ตารางที่ 2.6 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างวัตถุดิบธรรมชาติที่ใช้เพาะเห็ดถั่งเช่าต่อ 100 กรัม

สารอาหาร	ไข่ไก่	ข้าวโพด อ่อน	กล้วยน้ำว้า	ฟักทอง	น้ำมะพร้าว อ่อน	น้ำมะพร้าว แก่
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	143	33	89	26	18	-
โปรตีน (กรัม)	12.56	2.3	1.09	1.00	0.7	-
ไขมัน (กรัม)	9.51	0.3	0.2	0.10	0.2	-
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	0.72	5.3	22.84	6.50	3.71	-
ใยอาหาร (กรัม)	-	2.1	2.6	0.5	1.1	-
น้ำตาลทั้งหมด	0.37	-	12.23	2.76	2.6	-
วิตามิน	0.89	-	-	-	-	-
วิตามินบี 5 (มก.)	-	-	0.33	-	-	-
วิตามินบี 6 (มก.)	0.17	-	0.4	0.06	0.032	-
วิตามินดี (µg)	2.0	-	-	-	-	-
วิตามินเค	0.3	-	0.4	-	-	-
ไนอาซิน (B3) (มก.)	0.08	-	0.66	1.60	0.08	-
เบต้าแคโรทีน (µg)	-	12	492	-	-	-

ตารางที่ 2.6 คุณค่าทางโภชนาการในตัวอย่างวัตถุดิบธรรมชาติที่ใช้เพาะเห็ดถั่งเช่าต่อ 100 กรัม (ต่อ)

สารอาหาร	ไข่ไก่	ข้าวโพด อ่อน	กล้วยน้ำว้า	ฟักทอง	น้ำมะพร้าว อ่อน	น้ำมะพร้าว แก่
โทอะมิน (B1)(มก.)	0.04	0.13	0.031	0.05	0.03	-
ไรโบฟลาวิน (B2) (มก.)	0.46	0.15	0.073	0.11	0.057	-
เกลือแร่						
โซเดียม (มก.)	142	-	1	1	42	48
โพแทสเซียม (มก.)	138	-	358	340	290	247
แคลเซียม (มก.)	56	4	7	21	44	40
ฟอสฟอรัส (มก.)	198	25	22	44	9.2	6.3
แมกนีเซียม (มก.)	12	-	27	12	10	15
เหล็ก (มก.)	1.75	0.5	0.26	0.80	106	79
สังกะสี (มก.)	1.29	-	0.15	0.32	-	-

หมายเหตุ : ไข่ไก่ และฟักทอง อ้างอิง National Nutrient Database for Standard Reference Release 28 slightly revised May, (2016)

: น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ อ้างอิงปริมาณโพแทสเซียมจาก (Satyavati, 1987 อ้างโดย วิไลวรรณ 2550)

: กล้วยน้ำว้า อ้างอิงปริมาณโพแทสเซียมจาก <http://www.blocmeofficial.com>

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบทางเคมีของกากกล้วยเหลืองแยกเปลือก

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณร้อยละ
ความชื้น	13.0
น้ำมัน	2.0
โปรตีน	50.0
ใยอาหาร	4.0
เถ้า	7.0

ที่มา: บริษัทธนาคาร น้ำมันพืช, (2017)

2.8.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องการใช้วัตถุดิบทางธรรมชาติสำหรับการเพาะเลี้ยงถั่งเช่า

Kim et al., (2010) ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตดอกเห็ดของ *Cordyceps cardinalis* ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ธัญพืช 8 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนผสมกับผงดักแด้ในอัตราส่วนต่างๆ การทดลองพบว่า ข้าวกล้อง ข้าวฟ่างเยอรมัน และลูกเดี๋ยย สามารถผลิตดอกเห็ดที่มีความยาวสูงสุด ตามมาด้วย ข้าวบาร์เลย์จีน ลูกเดี๋ยยอินเดีย ข้าวสาลีดำ และข้าวบาร์เลย์ ส่วนการเพาะเลี้ยงในข้าวโอ๊ต ดอกเห็ดมีลักษณะสั้นที่สุด การเสริมดักแด้และตัวอ่อนหนอนซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนส่งผลให้มีการเพิ่มน้ำหนักของดอกเห็ดเล็กน้อย โดยอัตราส่วนที่ดีที่สุดคือ ข้าวกล้อง 50~60 กรัม และอัตราส่วนของผงดักแด้ใหม่ 10~20 กรัม ผสมกับน้ำ 50~60 มิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงขวดปริมาตร 1000

มิลลิลิตร โดยการใช้หัวเชื้อ 15-20 มิลลิลิตรต่อขวด เหมาะสมต่อการผลิตดอกเห็ดมากที่สุด และสภาวะที่เหมาะสมอุณหภูมิสำหรับการผลิต *Cordyceps cardinalis* คือ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะการใช้แสงต่อเนื่อง สามารถผลิตดอกเห็ดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ใช้แสง

Chioza and Ohga (2013) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *Paecilomyces hepialid* ในอาหารธัญพืช 12 สูตร พบว่าอาหารวุ้นที่ทำจากผงธัญพืชเพียงอย่างเดียวไม่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเส้นใยของ *P. hepiali* แต่พบว่าสูตรอาหาร Brown rice agar (BRA) ที่ประกอบด้วย ผงข้าวกล้องอบ 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้ผลการเจริญของดอกเห็ดได้ดีกว่าข้าวขัดสี การเพิ่มเปปโตเนสามารถเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ดอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นทั้งคู่ยังแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารแข็งที่ประกอบด้วย ผงข้าวกล้องอบ 40 กรัม กลูโคส 0.325 กรัม น้ำตาลซูโครส 0.65 กรัม เปปโตเน 2 กรัม และ corn steep liquor 65 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงในการสร้างเส้นใย เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เพาะเลี้ยงในสภาวะใช้แสงตลอดทั้งวัน ผลิตอุณหภูมิเป็น 17 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำให้เกิดปุ่มดอกเป็นเวลา 1 อาทิตย์ หลังจากนั้นใช้อุณหภูมิที่ 21 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-95 สามารถให้ผลน้ำหนักของดอกเห็ดสดมากที่สุด เท่ากับ 19.3 กรัมต่อขวด

Xie *et al.*, (2009) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้วัตถุดิบทางธรรมชาติ ได้แก่ ข้าวกล้อง ข้าวมอลต์ และกากถั่วเหลือง เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงงั้วเห็ดของแทนสารชีวเคมีและสารสังเคราะห์ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางธรรมชาติทั้ง 3 ชนิด มีสารอาหารที่จำเป็นและเพียงพอสำหรับการเจริญของงั้วเห็ด เนื่องจากส่วนประกอบของธาตุอาหารหลักของวัตถุดิบที่ต่างกัน โดยได้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ เนื่องจากในกากถั่วเหลืองมีโปรตีนที่ละลายน้ำได้และมีกรดอะมิโนอยู่เป็นจำนวนมากและได้คาร์บอนจากข้าวกล้องและข้าวมอลต์ในการเสริมการเจริญเติบโต

2.9 การออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรมสถิติ

2.9.1 วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM)

ในการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสม บางครั้งทำการศึกษาทดลองที่ละปัจจัย (One-at-a-time method) ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน ดังนั้นวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) จึงเป็นเทคนิคทางสถิติอย่างหนึ่งที่ใช้แผนภาพ surface plot ที่สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ ที่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับผลตอบสนอง เป็นคาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดยจะแสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง เมื่อระดับของปัจจัยเชิงปริมาณเปลี่ยนแปลง และสามารถหาระดับของปัจจัยเชิงปริมาณที่เหมาะสม (optimum value) ที่จะทำให้ออกผลตอบสนองที่ดีที่สุดหรือสามารถเลือกจุดที่เหมาะสมได้จากผลตอบสนองหลายๆ ค่าได้ โดยการตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) หรือการตอบสนองที่ต่ำสุด (minimum) วิธีการนี้ได้ถูกอธิบายและพัฒนาครั้งแรกโดย Box and Wilson (1951) ต่อมา Bradley (1958) ได้เขียนบทความเพื่ออธิบายในเชิงเป็นเครื่องมือทางคณิตศาสตร์และสถิติที่กำหนด

วิธีการพื้นผิวตอบสนองสำหรับหาสูตรหรือสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการแสดงหรือตัวแทนทางเรขาคณิตที่ได้รับเมื่อผลตอบสนองของตัวแปร (response) ถูก plot เป็นฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านั้น จากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรดังกล่าวทำให้สามารถพิจารณาผลตอบสนองของตัวแปรและปัจจัยที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆ กัน โดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้ คือ การวางแผนการทดลอง (experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมสร้างแผนภาพ (อัญชุลี ทองจับ, 2553)

แบบจำลองทั่วไป ดังสมการที่ 2.1

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) + \epsilon \quad (2.1)$$

โดย Y คือ ค่าตอบสนอง (response หรือ dependent variable)

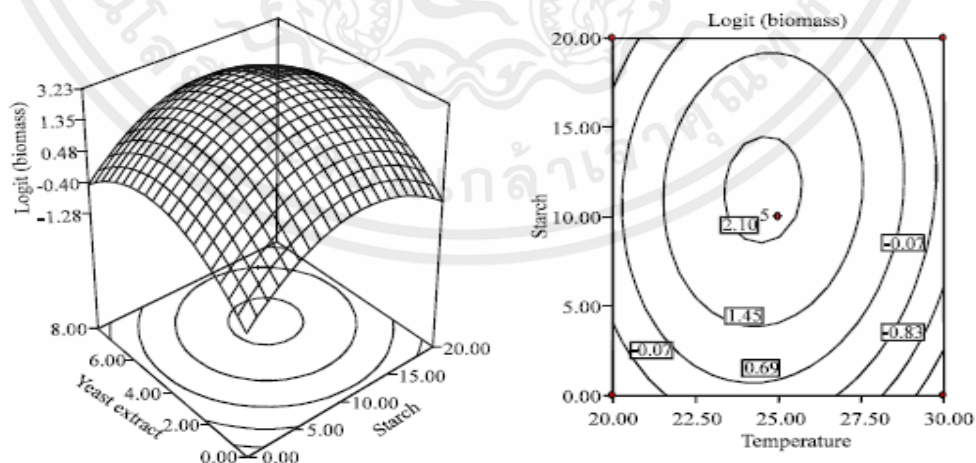
$X_1 + X_2 + \dots + X_n$ คือ ตัวแปรที่สนใจ (independent variable)

ϵ คือ เทอมของค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

ถ้ากำหนดว่า $E(Y) = f(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้นสามารถเขียนสมการของพื้นผิวตอบสนองได้ตามสมการที่ 2.2 คือ

$$\eta = f(X_1, X_2) \quad (2.2)$$

ซึ่งจะเรียกว่าพื้นผิวตอบสนอง (response surface) โดยส่วนใหญ่จะแสดงผลตอบสนองเป็นกราฟโครงร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) โดยที่ η จะถูกพล็อตกับระดับของ X_1 และ X_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ดังรูปที่ 2.4



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

รูปที่ 2.7 กราฟโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (ก) กราฟพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (surface plot) (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ (contour plot)

ที่มา: Hamedi *et al.* (2007)

อย่างไรก็ตามในการศึกษาโดยใช้วิธีการแสดงผลพื้นผิวตอบสนองนั้น จะต้องค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระกวางตัวแปรตามค่าตอบสนองต่อตัวแปรอิสระต่างๆ เป็นลำดับแรก การค้นหาฟังก์ชันต่างๆ เหล่านี้มักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (polynomial) ลำดับต้นๆ เช่น ลำดับหนึ่งหรือกำลังหนึ่ง (first order) และลำดับสองหรือกำลังสอง (second order) เป็นต้น โดยทั่วไปฟังก์ชันซึ่งประมาณความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression relationship) ดังสมการที่ 2.3

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.3)$$

ซึ่งสมการดังกล่าวเป็นสมการพื้นฐานง่ายสุดที่มักรู้จักกันว่าเป็นสมการลำดับที่หนึ่ง (first order model or equation) ส่วนรูปแบบลำดับที่สอง (second-order model) เป็นความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ดังสมการที่ 2.4 ซึ่งต้องใช้โพลีโนเมียลที่มีลำดับสูงขึ้น เช่น ลำดับสองหรือกำลังสอง (Saxena and Singh. 2010; อิศรพงษ์. 2550)

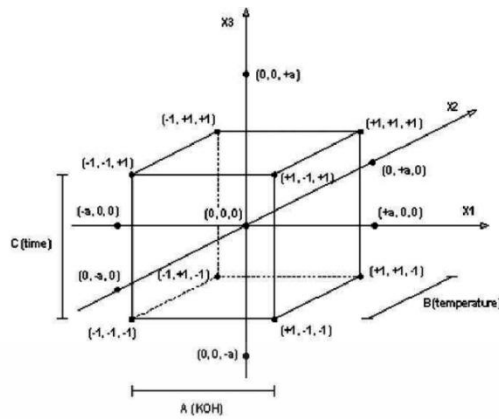
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2.4)$$

โดย

y	คือ	การตอบสนองโดยประมาณ
β_0	คือ	ค่าคงที่
β_i	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรงของตัวแปร
β_{ii}	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นโค้งของตัวแปร
β_{ij}	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร
X_i, X_j	คือ	ตัวแปรอิสระ (รหัสตัวเลข)

2.9.2 แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD)

สำหรับการทดลองงานวิจัยนี้เลือกใช้การวางแผนการทดลองแบบส่วนผสมกลาง (CCD) ซึ่งมีพื้นฐานมาจาก 2^n แฟกทอเรียล (factorial 2^k) อย่างไรก็ตาม CCD ที่มีตัวแปรอิสระหลายตัวแปรและให้หน่วยการทดลองที่ไม่มากเกินไป แต่ครอบคลุมจุดที่สำคัญ จึงเพิ่ม ระดับการทดลองแฟกทอเรียลที่จุดศูนย์กลาง (center point) และแนวแกน (axial point) โดยแบ่ง เป็น 5 ระดับ (Coelho *et al.* 2011) คือ ระดับต่ำสุด ($-\alpha$) ต่ำ (-1) กลาง (0) สูง (+1) และ ระดับสูงสุด ($+\alpha$) ดังรูปที่ 2.8 เพื่อสามารถสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์อันดับสองได้ และในการวางแผนการทดลองแบบ CCD มีการทดลองเท่ากับ $n = 2^k + (2k + m)$ เมื่อ k คือ ปัจจัยในการทดลองและ m คือจำนวนการทดลองซ้ำที่จุดศูนย์กลาง สำหรับการทดลองที่มีแปดตัวแปรหรือปัจจัย 3 ปัจจัย มีจุดกึ่งกลาง (center point) ซ้ำ 6 จุด จุดขอบ (axial point) จำนวน 6 จุด และ factorial point จำนวน 8 จุด แสดงดังตารางที่ 2.8 มี สามารถออกแบบการทดลองได้จำนวนการทดลองทั้งสิ้น 20 การทดลอง



รูปที่ 2.8 รูปแบบการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design แบบ 3 ปัจจัย 2 ระดับ
ที่มา: Ferella et al., (2010)

ตารางที่ 2.8 คาของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย 5 ระดับ

ชุดการทดลองที่ (treatment)	รหัสของปัจจัย			ระดับของปัจจัย		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	100	50	96
2	1	-1	-1	200	50	96
3	-1	1	-1	100	150	96
4	1	1	-1	200	150	96
5	-1	-1	1	100	50	144
6	1	-1	1	200	50	144
7	-1	1	1	100	150	144
8	1	1	1	200	150	144
9	-1.682	0	0	65.9	100	120
10	1.682	0	0	234.1	100	120
11	0	-1.682	0	150	15.9	120
12	0	1.682	0	150	186.1	120
13	0	0	-1.682	150	100	79
14	0	0	1.682	150	100	160
15	0	0	0	150	100	120
16	0	0	0	150	100	120
17	0	0	0	150	100	120
18	0	0	0	150	100	120
19	0	0	0	150	100	120
20	0	0	0	150	100	120

ที่มา: Montgomery (1991)

2.9.3 การวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis)

ในทางปฏิบัติเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองจำเป็นต้องอาศัยสมการสำหรับประมาณค่าตอบสนองที่แท้จริง โดยถ้ากำหนดตัวแปรที่นำมาศึกษาตัวหนึ่งเป็นตัวแปรตาม ส่วนตัวแปรที่เหลือเป็นตัวแปรอิสระจะใช้หลักการวิเคราะห์การถดถอย เพื่อศึกษาว่าตัวแปรอิสระที่กำหนดมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามมากน้อยเพียงใด โดยลักษณะความสัมพันธ์จะแทนด้วยสมการถดถอย (regression equation) ซึ่งหาจากวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least square method) สมการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้นจะพิจารณาได้จากค่าสถิติ เช่น ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) และการทดสอบสมมติฐาน เพื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยบางค่าเท่ากับศูนย์หรือไม่ นั่นคือตัวแปรอิสระบางตัวแปรมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามอย่างไร โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น SPSS, SAS และ Microsoft Excel เป็นต้น

2.9.3.1 รีเกรสชันเส้นตรงแบบง่าย (simple linear regression)

หากต้องการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระตัวแปรเดียว (X) และค่าตอบสนอง (Y) ตัวแปร X มักเป็นตัวแปรชนิดต่อเนื่อง นั่นคือสามารถควบคุมได้ด้วยผู้ทดลองซึ่งให้ค่าตอบสนองที่สังเกตได้ หากความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y เป็นเส้นตรง จะได้สมการถดถอยของดังสมการที่ 2.5

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (2.5)$$

โดย Y คือ ตัวแปรตาม
 X คือ ตัวแปรอิสระ
 β_0 คือ ค่าคงที่
 β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรง
 ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

จากสมการข้างต้นสามารถเขียนเป็นสมการถดถอยเพื่อพยากรณ์ผลตอบสนองได้ดังสมการที่ 2.6

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n \quad (2.6)$$

โดย Y คือ ค่าพยากรณ์ของตัวแปรตาม
 X คือ ตัวแปรอิสระ
 b_0 คือ ค่าคงที่จากการประมาณค่า β_0
 b_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรงจากการประมาณค่า β_1
 b_n คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรงจากการประมาณค่า β_n

ทั้งนี้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เป็นการแสดงผลของตัวแปรต่อค่าตอบสนองที่สามารถอธิบายได้และส่วนที่เหลือคือส่วนที่อธิบายไม่ได้ ดังนั้นหากสมการใดที่มีค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใด ความแม่นยำ

ยาของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์ยอมมีสูงยิ่งขึ้นโดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจอย่างน้อย 0.75 (Haaland, 1989 และ Hu, 1999) หากสูงกว่า 0.9 ถือว่าดีมาก ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆระหว่างตัวแปรอิสระและค่าตอบสนอง และ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์

ในการวิเคราะห์รีเกรสชันต้องทำการทดสอบสมมติฐาน ดังนี้

$$H_0 = \beta_1 = 0$$

$$H_1 = \beta_1 \neq 0$$

หากยอมรับ H_0 ($p > 0.05$) แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและค่าตอบสนองในทิศทางตรงกันข้าม หากปฏิเสธ H_0 ($p \leq 0.05$) แสดงว่าย่อมมีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามและค่าตอบสนอง หรือหากค่า $P > 0.05$ แสดงว่าสมการที่กำหนดไว้นั้นไม่มีความสำคัญทางสถิติ

2.9.3.2 รีเกรสชันเส้นตรงแบบหลายตัวแปร (multiple linear regression)

การวิเคราะห์ความถดถอยด้วยรีเกรสชันเส้นตรงแบบหลายตัวแปรเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม (Y) 1 ตัวแปรกับตัวแปรอิสระ (X) ตั้งแต่ 2 ตัวแปรขึ้นไป โดยที่รูปแบบและการศึกษาจะคล้ายกับการวิเคราะห์ความถดถอยอย่างง่ายในการทดลอง ซึ่งหากความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y เป็นเส้นตรงสมการที่ได้อาจแสดงดังสมการที่ 2.7

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2.7)$$

แต่ถ้าความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y ไม่เป็นเส้นตรงสมการที่ได้อาจเป็นอื่นๆ ได้แก่

สมการถดถอยแบบควอดราติก คือ $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1^2 + \dots + \beta_k x_k^2 + \varepsilon$

สมการถดถอยแบบคิวบิก คือ $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1^2 + \beta_3 x_1^3 + \dots + \beta_k x_k^3 + \varepsilon$

สมการถดถอยแบบเอกซ์โพเนนเชียล คือ $y = \beta_0 \beta_1^x + \varepsilon$

โดย β_0 คือ ค่าคงที่

β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรงของตัวแปร X_1

k คือ จำนวนตัวแปรอิสระและ $k \geq 2$

ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

โดยการทดสอบสมมติฐาน ดังนี้

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k$$

หากสมมติฐานนี้เป็นจริง $H_1 = \beta_i \neq 0$ อย่างน้อย 1 ตัวแปร นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น คือทั้งนั้นเพื่อให้ได้ผลที่เป็นบวกและต้องคำนึงถึงเป็นบวกออกการที่ว่าการนี้ไปใช้

หากผลการทดสอบสมมติฐานปฏิเสธ H_0 แสดงว่า มี β อย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0 เมื่อทำการวิเคราะห์รีเกรสชันได้สมการแล้วจากสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปรทำให้ทราบได้ว่าตัวแปรใดมีอิทธิพล

สูงกว่าหากสัมพันธ์ของตัวแปรสูงกว่าตัวแปรอื่น (ไม่คิดเครื่องหมายบวกหรือลบโดยเครื่องหมาย
 ดังกล่าวแสดงถึงความสัมพันธ์ที่แปรผันตามหรือผกผัน) ย่อมแสดงว่าตัวแปรนั้นมีอิทธิพลต่อค่า
 ตอบสนองสูงกว่าอีกตัวแปรหนึ่งนอกจากนี้อาจสังเกตได้จากค่า P ของตัวแปรโดยยิ่งค่า P น้อยเท่าใด
 จะมีอิทธิพลมากขึ้นเท่านั้น (อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2550)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

เครื่องมืออุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมืออุปกรณ์

3.1.1 เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ รุ่น CH30RF200 (Olympus, Japan)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น ARC120 (OHAUS, USA)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AR 2140 (OHAUS, USA)
4. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น LC solution (SHIMADZU, Japan)
5. ตัวกรองเมมเบรนไนลอนขนาด 0.22 ไมครอน
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น UB-10 (Denver Instrument, USA)
7. เครื่องกวนสารให้ความร้อน รุ่น UC152 (Stuart, England)
8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น HERMLE, Germany
9. เครื่องปั่นตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น Hermle, Germany
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น ES-315 (Tomy Digital Biology Co., Ltd., Japan)
11. เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator) รุ่น ETLIS TED, Germany
12. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560E บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. ชุดกรองสุญญากาศ (Pyrex, Germany)
14. ตู้เย็น รุ่น SR-595 (Sanyo, Japan)
15. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
16. ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส รุ่น Contherm design series oven (Contherm Scientifica, New Zealand)
17. ตู้อบลมร้อนแบบสุญญากาศ (Vacuum Oven) รุ่น VD 23 ยี่ห้อ Binder, Germany
18. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) (Boss Tech Co., Ltd., USA)
19. ตู้อบลมร้อน 105 องศาเซลเซียส รุ่น WTC Linder (Binder GmbH, Germany)
20. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) รุ่น LSI-5002M ยี่ห้อ Daihan Lab Tech
21. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีและจุลชีววิทยา
22. ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan) สารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารประกอบการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม 22. ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan) สารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้อ PDA เสริม (ภาคผนวก ก1)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อหัวเชื้อ PDB เสริม (ภาคผนวก ก2)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม (ภาคผนวก ก3)
4. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) บริษัท Ajax, Australia
5. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 (H_2SO_4) บริษัท JK-Baker, China
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Univa, Australia
7. ดีเอ็นเอส (3, 5-Dinitrosalicylic acid; ($C_7H_4N_2O_7$)) บริษัท Sigma, USA
8. ทริปโตเนก Becton, Dickinson and Company
9. น้ำบริสุทธิ์สูง
10. น้ำกลั่น
11. ฟีนอล (C_6H_5OH) บริษัท PS Panreac, E.U.
12. เมทานอลบริสุทธิ์ (HPLC grade) Macron
13. สารสกัดจากยีสต์ Becton, Dickinson and Company
14. สารมาตรฐานคอร์โดเซปิน บริษัท Sigma, USA
15. สารมาตรฐานอะดีโนซีน บริษัท Sigma, USA
16. แอลกอฮอล์ร้อยละ 95
17. เอทานอลบริสุทธิ์ (HPLC grade) ยี่ห้อ J.T. Baker

3.1.3 วัตถุดิบ

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวมันปู ไข่ไก่ ฟักทอง ข้าวโพดอ่อน มันฝรั่ง จาก
ท็อปมาร์เก็ต สาขาลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะพร้าวแก่ กล้วยน้ำว่า จากตลาดสดหัวตะเข้ ลาดกระบัง กรุงเทพ
ผักแต้ใหม่ จาก แมคโคร สาขาบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว จาก อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
กากถั่วเหลืองบด จาก บริษัท ธนากรน้ำมันพืช จำกัด จ.สมุทรปราการ

3.1.4 เชื้อจุลินทรีย์

ถั่วงอก (Isaria tenuipes) จากสถานีเห็ด อ.คลองสาม จ.ปทุมธานี เพาะเลี้ยงเชื้อใน
อาหารเหลวพีดีบี อายุ 14 วัน

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อถั่วงอกในอาหารเหลวพีดีบี นำมาเพาะเลี้ยงบนผักแต้ใหม่ 40 กรัม ในขวดแก้ว (เส้นผ่าน
ศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร x สูง 14 เซนติเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 15 นาที ถ่ายเชื้อลงบนดักแด้ใหม่ 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อราในสภาวะที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-90 จนเส้นใยเจริญเต็มดักแด้ใหม่ จากนั้นให้แสงกระตุ้นให้เกิดการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ความเข้มของแสง 300-400 ลักซ์ เมื่อครบ 15 วัน หลังจากให้แสง ตัดดอกเห็ดเป็นชิ้นขนาด 1 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม (ภาคผนวก ก1) ระยะเวลา 7 วัน ก่อนนำมาทดลอง (เชื้อที่ใช้ทดลองโดยจะเลี้ยงถึงเข้าหิมะลงบนดักแด้ใหม่ให้เกิดการสร้างดอกไปเรื่อยๆ ในระหว่างการทำการทดลอง)

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของถั่วงอกเห็ด

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยถั่วงอกเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม ศึกษาด้วยวิธี slide culture เพื่อดูลักษณะเส้นใยและรูปร่างคอนิไดโอสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และเพาะเลี้ยงถั่วงอกเห็ดบนดักแด้ใหม่เพื่อตรวจสอบลักษณะโครงสร้างและรูปร่างของดอกเห็ด

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงถั่วงอกเห็ดด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

3.4.1 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง Central Composite Design (CCD)

งานวิจัยนี้ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ร่วมกับการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design; CCD ในงานวิจัยนี้ทำการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่วงอกเห็ด โดยมีปัจจัยหรือตัวแปรอิสระ (Independent Variable) ที่เลือกศึกษา 3 ปัจจัย คือ ความเร็วในการเขย่า (X_1) ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (X_2) และเวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ (X_3) ทำการทดลองปัจจัยละ 5 ระดับ แทนด้วยสัญลักษณ์ คือ $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$ โดยมีตัวแปรตามหรือค่าตอบสนอง (dependent variation) คือน้ำหนักเส้นใยแห้ง รายละเอียดการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1 สามารถออกแบบชุดทดลองได้ทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง ดังตารางที่ 3.2 ประกอบด้วยระดับของปัจจัย คือ factorial point จำนวน 8 การทดลอง จุดขอบ (axial point) จำนวน 6 การทดลอง และจุดกึ่งกลาง (center point) จำนวน 6 การทดลอง ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษากับค่าตอบสนองด้วยสมการที่ 3.1

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3.1)$$

เมื่อ Y คือ ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง (response variables)

β_0 คือ ค่าระดับของ y เมื่อ x เท่ากับศูนย์ (constant)

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรง (linear coefficients)

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นโค้ง (กำลังสอง) (quadratic coefficients)

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงปฏิภพสัมพันธระหว่างตัวแปร (coefficient of the Interaction between the factors)

X_1, X_2, X_3 คือ ตัวแปรอิสระ (Independent variable)

3.4.2 การสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จาก CCD จะนำมาวิเคราะห์เพื่อสร้างสมการ Quadratic กำลังสอง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรต่างๆที่ทำการศึกษากับผลน้ำหนักรีดไขมันแห้ง เพื่อสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) ในรูปแบบสามมิติ (3D) และกราฟเส้นโครงร่างพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plots) โดยใช้ตัวแปรที่มีปฏิสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแต่ละกราฟจะแสดงผลของการทดลองและค่าคงที่ที่ระดับ 0 ดังนั้นส่วนนูนในกราฟพื้นผิวตอบสนองหรือจุดศูนย์กลางของวงกลมในกราฟเส้นโครงร่าง จึงเป็นค่าของระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในแต่ละตัวแปร และเมื่อแทนค่าลงในสมการจะได้ค่าที่มากที่สุดของน้ำหนักรีดไขมันแห้ง ซึ่งเป็นค่าจากการทำนาย (predicted value)

3.4.3 วิธีการเลี้ยงหัวเชื้อ

นำราถั่งเช่าหิมะที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม อายุ 7 วัน เจาะเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ย้ายขึ้นวุ้นจำนวน 4 ชิ้น ลงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDB เสริม ที่ประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม กลูโคส 10 กรัม เปปโตน 5 กรัม และ ยีสต์สกัด 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก-2) โดยผ่านการฆ่าแล้ว ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงตามกระบวนการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ดังตารางที่ 3.2 ชุดการทดลองละ 3 ขั้ว เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีด

3.4.4 วิธีการวิเคราะห์ผลน้ำหนักรีดไขมันแห้ง

เก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ของแต่ละชุดการทดลองใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ แยกเส้นใยด้วยเครื่องปั่นตักตะกอน ที่ความเร็วรอบ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งทำการล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักรีดไขมันแห้ง (ดัดแปลงจาก AOAC, 1995) โดยนำเส้นใยที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักให้ได้ผลคงที่ และนำมาคำนวณหาปริมาณน้ำหนักรีดไขมันแห้งของถั่งเช่าหิมะ

ตารางที่ 3.1 ค่าระดับของแต่ละปัจจัย ในแผนการทดลอง CCD ที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ

ตัวแปรอิสระ independent	สัญลักษณ์	ระดับ					หน่วย
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$	
1. ความเร็วในการเขย่า	X_1	65.9	100	150	200	234.1	รอบต่อนาที
2. ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร	X_2	15.9	50	100	150	184.2	มิลลิลิตร
3. เวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ	X_3	79.63	96	120	144	160.36	ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 5 ระดับ

ชุดการทดลองที่ (treatment)	รหัสของปัจจัย			ระดับของปัจจัย		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1	100	50	96
2	1	-1	-1	200	50	96
3	-1	1	-1	100	150	96
4	1	1	-1	200	150	96
5	-1	-1	1	100	50	144
6	1	-1	1	200	50	144
7	-1	1	1	100	150	144
8	1	1	1	200	150	144
9	-1.682	0	0	65.9	100	120
10	1.682	0	0	234.1	100	120
11	0	-1.682	0	150	15.9	120
12	0	1.682	0	150	186.1	120
13	0	0	-1.682	150	100	79
14	0	0	1.682	150	100	160
15	0	0	0	150	100	120
16	0	0	0	150	100	120
17	0	0	0	150	100	120
18	0	0	0	150	100	120
19	0	0	0	150	100	120
20	0	0	0	150	100	120

หมายเหตุ : X_1 คือ อัตราในการเขย่า X_2 คือ ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และ X_3 คือ เวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อหนึ่งชุดการทดลอง

3.5 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในงานวิจัยนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ One-Way ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 20

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อเหลว

การเตรียมหัวเชื้อถั่งเช่าหิมะเตรียมได้จากการทดลองในข้อที่ 3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ โดยเจาะเส้นใยถั่งเช่าหิมะที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม จำนวน 4 ชิ้น ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ปัจจัยที่เหมาะสม คือ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDB เสริม (ภาคผนวก ก-2) ปริมาตร 105 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ความเร็วในการเขย่าที่ 178.9 รอบต่อนาที และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ 106 ชั่วโมง ในที่มืด โดยควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส

3.5.2 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.5.2.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1. เตรียมเมล็ดข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะ 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวมันปูแดง และข้าวเหนียวดำลิ้มผิว ชนิดละ 40 กรัม ลงในขวดแก้วปากกว้าง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร x สูง 14 เซนติเมตร)
2. ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตรต่อขวด (การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อภาคผนวก ก-3) ที่ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม กลูโคส 20 กรัม เปปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม และดักแด้ใหม่ 30 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
3. ปิดฝาขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
4. ทิ้งอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อไว้ให้เย็น แล้วทำการถ่ายหัวเชื้อถั่งเช่าหิมะลงบนอาหารที่มีความแตกต่างกันของแหล่งคาร์บอนทั้ง 5 ชนิด โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อขวด

3.5.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยง

1. หลังจากลงเชื้อแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-90 โดยไม่ใช้แสง
2. สังเกตเส้นใยเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วย้ายไปเลี้ยงในสภาวะที่ใช้แสง เพื่อกระตุ้นการเกิดดอกความเข้มแสง 300-400 ลักซ์ เพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะใช้ระยะเวลา 25 วันนับจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดนำไปวิเคราะห์ผล

3.5.2.3 การวิเคราะห์ผล

1. วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด
2. วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารคอร์ไดเซปิน สารอะดีโนซีน และสารพอลิแซ็กคาไรด์
3. เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ทางสถิติ และนำผลที่เหมาะสมที่สุดไปทดสอบขั้นต่อไป

3.5.3 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

หลังจากคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองในข้อที่ 3.5.2 จึงนำมาเป็นวัตถุดิบหลักในการทดสอบหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเจริญของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตไนซ์ไก่ กากถั่วเหลืองบด และทริปโตไนซ์ โดยเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนของชุดควบคุม คือยีสต์สกัดผสมกับเปปโตไนซ์ และกำหนดให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันที่ 1.34 กรัมต่อลิตร

3.5.3.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1. ทำการผสมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม โดยชั่งตัวอย่างไนโตรเจนดังนี้ ยีสต์สกัด 12.07 กรัม เปปโตไนซ์ 8.59 กรัม ไช้ไก่ 66.67 กรัม กากถั่วเหลืองบด 16.75 กรัม และทริปโตไนซ์ 9.64 กรัมต่อลิตร (การคำนวณปริมาณของไนโตรเจนภาคผนวก ข) ผสมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดลงในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม (ภาคผนวก ก-3) ส่วนชุดควบคุมจะใช้ ยีสต์สกัดผสมกับเปปโตไนซ์ อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร

2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ลงบนเมล็ดข้าว 40 กรัม ที่ได้รับคัดเลือกจากข้อที่ 3.5.2 ปิดฝาขวดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. ถ่ายหัวเชื้อถั่วเขียวลงบนอาหารที่มีความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อขวด

3.5.3.2 สภาวะการเพาะเลี้ยง

สภาวะของการเพาะเลี้ยงถั่วเขียวเหมือนกับหัวเชื้อที่ 3.5.2

3.5.3.3 การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนกับเหมือนกับหัวเชื้อที่ 3.5.2

3.5.4 การศึกษาชนิดของธาตุโพแทสเซียมที่มีผลต่อการเจริญของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการทดลองข้างต้นเมื่อได้ชุดการทดลองที่เหมาะสมแล้ว จากนั้นทำการทดลองโดยเสริมธาตุโพแทสเซียม (K) ที่ได้จาก กล้วย ฟักทอง น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ กำหนดความเข้มข้นของ โพแทสเซียม เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร (เทียบจากปริมาณของธาตุโพแทสเซียมที่ประกอบอยู่ในวัตถุดิบที่นำมาทดลอง) โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีส่วนประกอบของข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้รับคัดเลือกจากข้อที่ 3.5.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง

1. เตรียมกล้วยน้ำว้า 279 กรัม พักทอง 294 กรัม น้ำมะพร้าวอ่อน 345 กรัม น้ำมะพร้าวแก่ 405 กรัมต่อลิตร (วิธีการคำนวณปริมาณของธาตุโพแทสเซียม ภาคผนวก ข10) เสริมลงไปในส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม (ภาคผนวก ก3)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้างต้น ผสมลงในข้าวที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกจากข้อ 5.5.2 ปิดฝาขวดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. ทำการถ่ายหัวเชื้อลงเข้าหิมะลงบนอาหารที่มีความแตกต่างของแหล่งโพแทสเซียมทั้ง 4 ชนิด โดยใช้หัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด

3.5.4.2 สภาพการเพาะเลี้ยง

สภาพของการเพาะเลี้ยงลงเข้าหิมะเหมือนกับหัวข้อที่ 3.5.2

3.5.4.3 การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลการทดลองเหมือนกับเหมือนกับหัวข้อที่ 3.5.2

3.5.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.5.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด

การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างดอกเห็ดทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดลงเข้าหิมะแต่ละขวดเมื่อครบ 25 วัน หลังกจากให้แสง เก็บเฉพาะส่วนของดอกไม่รวมฐาน ใส่ลงบนภาชนะที่ทราบค่าแล้วนำไปทำแห้งด้วยตู้อบร้อนแบบสุญญากาศ โดยใช้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณหาน้ำหนักแห้งดอกเห็ด

3.5.5.2 การวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน

วิธีการสกัดดัดแปลงจาก Wang *et al.*, (2015) สกัดตัวอย่างกับน้ำบริสุทธิ์สูง อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารทั้งสองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.6 มิลลิเมตร x 250 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร) อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส ใช้น้ำบริสุทธิ์สูงต่อเมทานอล อัตราส่วน 85:15 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของตัวอย่างที่ทดสอบ 1 ไมโครลิตร และทำการวิเคราะห์โครมาโตแกรมที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Li *et al.*, 2015)

3.5.5.3 การวิเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์

โดยใช้ผงเห็ดสกัดกับน้ำร้อน (1:20) (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกของเหลวใสมาทดสอบด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 4 เท่าของตัวอย่าง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นตตะกอน ที่ 10000 g นาน 20 นาที (Zhu *et al.*, 2016) จากนั้นใช้ก๊าซไนโตรเจนเป่าไล่ไอระเหยของสารละลายออกจากตะกอน นำไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งน้ำหนักตะกอนก่อนนำไปทดสอบ การทดสอบหาสารพอลิแซ็กคาไรด์ จะได้จากส่วนต่างของการทดสอบหาน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol Sulfuric acid (Dubois. 1956) (ภาคผนวก ข6) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS Method (Miller. 1959) (ภาคผนวก ข7)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

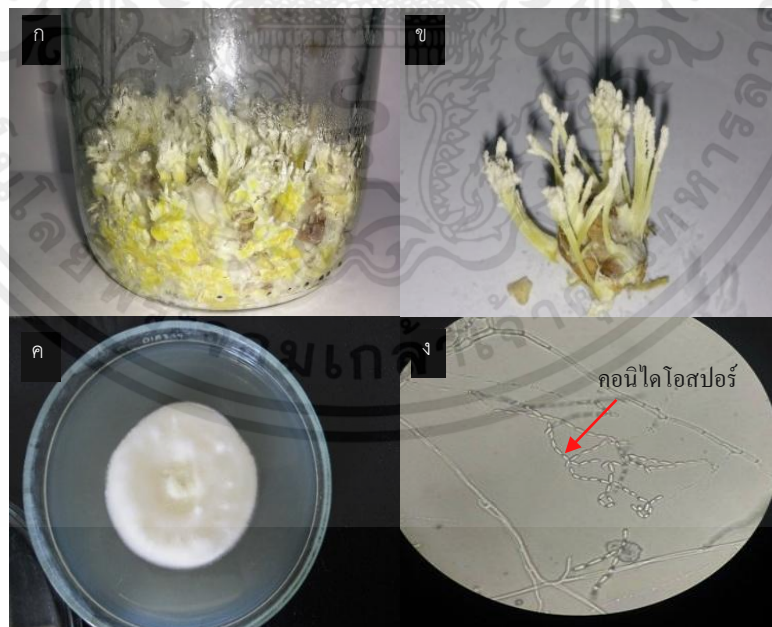
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาถิ่นฐานวิทยาและสรีระวิทยาเบื้องต้นของถั่งเช่าหิมะ

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะของถั่งเช่าหิมะบนอาหารแข็งและดักแด้ใหม่

การเจริญของถั่งเช่าหิมะบนดักแด้ใหม่ ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อน ความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร กิ่งก้านแตกแขนงลักษณะคล้ายปากการัง มีสปอร์ปกคลุมด้านบนสุดของดอก แสดงดังรูปที่ 4.1 (ก-ข) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการศึกษาของ Yamanaka *et al.*, (1998) ที่เกิดในธรรมชาติในประเทศญี่ปุ่น และ Ban *et al.*, (1998) ที่พบในประเทศเกาหลี และคล้ายกับ Supothina *et al.*, (2011) ศึกษาลักษณะของถั่งเช่าหิมะบนเมล็ดธัญพืชในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

จากการศึกษาลักษณะเส้นใยถั่งเช่าหิมะบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม เส้นใยมีสีขาว เจริญฟูบนผิวหน้าอาหารเป็นวงกลม เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค slide culture ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าถั่งเช่าหิมะสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate hypha) และสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า โคนิเดียม (conidium) หรือคอนิโดไอสปอร์ มีรูปร่างเป็นรูปรี เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ เกิดที่ปลายของเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore) ที่มีลักษณะเรียวยาว (สิริภค สุระพร, 2009) แสดงดังรูปที่ 4.1 (ค-ง)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

รูปที่ 4.1 ลักษณะถิ่นฐานเบื้องต้นของถั่งเช่าหิมะ (ก)และ(ข) ถั่งเช่าหิมะเจริญเป็นฟรุตติ้งบอดี้บน ดักแด้ใหม่ (ค) เส้นใยถั่งเช่าหิมะเจริญบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม (ง) คอนิโดไอสปอร์ ต่อกันเป็นสายโซ่

4.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ

4.2.1 ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถังเช่าหิมะโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

4.2.1.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองนี้ได้นำวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) และการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD) มาประยุกต์ใช้เพื่อคัดเลือกระดับปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถังเช่าหิมะในสภาวะอาหารเหลว รายงานของ Myers (1995) ได้กล่าวไว้ว่า RSM และ CCD เป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือเนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้ความรู้ทางคณิตศาสตร์และสถิติมาช่วยในการคำนวณผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด

จากการทดลองได้ทำการศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ โดยพิจารณาผลจากค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ผลตอบสนอง) ผลการทดลองพบว่าความเร็วรอบในการเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที โดยมีปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 96 ชั่วโมง มีค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดที่ 12.39 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยกับชุดการทดลองในจุดกึ่งกลาง (center point) คือชุดการทดลองที่ 15 ถึง 20 แสดงดังตารางที่ 4.1

จากผลการทดลองทั้งหมด เมื่อนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิคในการหาพื้นที่การตอบสนองทางสถิติ ANOVA ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 20.0 เพื่อหาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษากับค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง โดยใช้สมการแบบจำลองพหุนามกำลังสองในการทำนายผลของน้ำหนักเส้นใยแห้ง แสดงในสมการที่ 4.1 ในการสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรนั้น ได้กำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (4.1)$$

เมื่อ

Y คือ ผลน้ำหนักเส้นใยแห้ง

β_0 คือ ค่าคงที่ (constant)

β_1, β_2 และ β_3 คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรง (linear coefficients)

β_{11}, β_{22} และ β_{33} คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นโค้ง (กำลังสอง) (quadratic coefficients)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร β_{12}, β_{13} และ β_{23} คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (coefficient of the interaction between the factors) ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X_1, X_2 และ X_3 คือ ตัวแปรอิสระ (independent variable)

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตหัวเชื้อของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย			รหัสปัจจัย			น้ำหนักเส้นใยแห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	ค่าการคาดคะเน	ค่าการทดลอง
1	100	50	96	-1	-1	-1	5.29	4.81
2	200	50	96	1	-1	-1	9.6	8.57
3	100	150	96	-1	1	-1	4.83	4.09
4	200	150	96	1	1	-1	13.77	12.39
5	100	50	144	-1	-1	1	7.22	5.44
6	200	50	144	1	-1	1	8.46	7.82
7	100	150	144	-1	1	1	1.58	0.99
8	200	150	144	1	1	1	7.44	6.55
9	66	100	120	-1.682	0	0	2.03	1.42
10	234	100	120	1.682	0	0	9.49	11.11
11	150	16	120	0	-1.682	0	9.52	10.23
12	150	186	120	0	1.682	0	8.28	9.69
13	150	100	80	0	0	-1.682	10.42	11.85
14	150	100	160	0	0	1.682	6.73	7.42
15	150	100	120	0	0	0	12.33	12.33
16	150	100	120	0	0	0	12.33	12.32
17	150	100	120	0	0	0	12.33	12.21
18	150	100	120	0	0	0	12.33	12.24
19	150	100	120	0	0	0	12.33	12.27
20	150	100	120	0	0	0	12.33	12.22

หมายเหตุ: X₁ คือ ความเร็วรอบในการเขย่า X₂ คือ ปริมาณอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร X₃ คือ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ

จากนั้นทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการพิจารณาค่า p-value ของสัมประสิทธิ์แต่ละตัวแปรที่แสดงในตารางที่ 4.2 โดยพจน์ที่มีความสัมพันธ์ต่อค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 นั้นต้องมีค่า p-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ตัวแปรนั้นจึงจะปรากฏในสมการ จากนั้นพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลอง โดยพิจารณาจากค่า F ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งแบบจำลองจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ก็ต่อเมื่อค่า F ที่ได้จากเปิดตารางสถิติต้องมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม ที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 และยังสามารถตรวจสอบค่าความสมบูรณ์ หรือค่าความพอเพียงของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (lack of Fit) พิจารณาจากค่า p-value ของค่าความสมบูรณ์ต้องมีค่ามากกว่า 0.05 (P-Lack of fit > 0.05) ไม่มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติร้อยละ 95

4.2.1.1 ผลของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i)

การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) ดดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20.0 และใช้วิธี Response surface regression ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปร (X_i) โดยโปรแกรม SPSS

รหัสของตัวแปร	Coefficients	Bata (β_i)	t-value	p-value
Constant	β_0	12.334	58.216	0.000 ^a
X_1	β_1	2.545	17.666	0.000 ^a
X_2	β_2	-0.370	-2.571	0.013 ^a
X_3	β_3	-1.097	-7614	0.000 ^a
$X_1 X_2$	β_{12}	1.155	6.036	0.000 ^a
$X_1 X_3$	β_{13}	-0.769	-3570	0.001 ^a
$X_2 X_3$	β_{23}	-1.296	-6.774	0.000 ^a
X_1^2	β_{11}	-2.519	-18.347	0.000 ^a
X_2^2	β_{22}	-1.213	-8.835	0.000 ^a
X_3^2	β_{33}	-1.328	-9.676	0.000 ^a

Coefficient of correlation $R^2 = 0.951$ $R^2(\text{adj}) = 0.947$

หมายเหตุ : ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่กำกับด้วย ^a คือ p-value < 0.05

โดยที่ coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร

t-value คือ สถิติที่ใช้ทดสอบ

p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

4.2.1.2 การวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปร

(Test on Individual Regression Coefficients)

เมื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังสมการที่ 4.2 ขึ้นตอนต่อไปเป็นการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย เป็นการทดสอบว่าตัวแปรอิสระ (X_i) แต่ละตัวในสมการที่ 4.2 นั้น มีอิทธิพลหรือไม่ต่อตัวแปรตาม (น้ำหนักเส้นใยแห้ง) โดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$H_0: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k = 0$ ตัวแปรอิสระที่ i (X_i) ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสาร $H_1: \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \neq 0$ ตัวแปรอิสระที่ i (X_i) มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาในส่วนของสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรง ได้แก่ X_1, X_2 และ X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.000, 0.013 และ 0.000 ตามลำดับ ที่นัยสำคัญที่ 0.05 พบว่าค่า p-value ของตัว

แปรอิสระ X_1 , X_2 และ X_3 มีค่าน้อยกว่า 0.05 ซึ่งหมายความว่า ปัจจัยในเทอมนี้มีความสัมพันธ์กับ น้ำหนักเส้นใยแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และในส่วนของเทอม ค่าสัมประสิทธิ์เชิงยกกำลังสอง ตัวแปรอิสระ ได้แก่ X_1^2 , X_2^2 และ X_3^2 และค่าสัมประสิทธิ์เชิงอันตรกิริยา ตัวแปรอิสระ ได้แก่ X_1X_2 , X_1X_3 และ X_2X_3 มีค่า p-value เท่ากับ 0.000 ทุกตัวแปร และมีค่าน้อยกว่า 0.05 ดังนั้นสามารถสรุปสมมติฐานได้ว่าตัวแปรอิสระในทุกเทอมในสมการที่ 4.2 มีอิทธิพลต่อค่า น้ำหนักเส้นใยแห้ง โดยปฏิเสธ H_0 ดังนั้นสามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 4.2 ได้

เมื่อพิจารณาครบทุกส่วนแล้วสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า น้ำหนักเส้นใยแห้งกับตัวแปรอิสระ ดังสมการที่ 4.2

$$Y = 12.334 + 2.545X_1 - 0.370X_2 - 1.097X_3 + 1.155X_1 X_2 - 0.769X_1 X_3 - 1.296X_2 X_3 - 2.519X_1^2 - 1.213 X_2^2 - 1.328 X_3^2 \quad (4.2)$$

4.2.1.4 การวิเคราะห์นัยสำคัญของแบบจำลอง (Test for Significant of Regression)

เป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของตัวแปรอิสระทุกตัวพร้อมๆกันโดย กำหนดสมมติฐานดังนี้

$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$ ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1: \beta_j \neq 0$ มีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

ในการทดสอบสมมติฐานจะพิจารณาจากผลรวมกำลังสองทั้งหมด (SST: Total Sum of Squares) ซึ่งเป็นผลบวกระหว่าง ผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากตัวแบบ (SSE: Sum of Squares due to Regression) กับผลรวมกำลังสองของความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (SSE: Sum of Squares due to Regression error) สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานคือค่า F ซึ่งสามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า F ที่ได้จากโปรแกรม แสดงดังตารางที่ 4.3 มีค่าเท่ากับ 108.003 แต่ค่า F ที่เปิดจากตารางสถิติมีค่าเท่ากับ 2.07 ($F_{0.05,9,50}$) เมื่อกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เป็น 0.05 ดังนั้นแสดงว่าแบบจำลองมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 เนื่องจาก F ที่ได้จากตารางสถิติมีค่าน้อยกว่า ค่า F ที่ได้จากโปรแกรม ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0

จากนั้นสามารถพิจารณาได้จากค่า p-value ของแบบจำลองการถดถอย (regression model) โดยที่จะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อ p-value มีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด ($p < 0.05$) จาก ตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า p-value ของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับ นัยสำคัญ ดังนั้นจึงปฏิเสธ H_0 จึงสรุปได้ว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อตัวแปร ตาม ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสมการถดถอยมีความเหมาะสมสามารถนำไปพยากรณ์ตัวแปรได้ (Du *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2009)

การทดสอบความสมบูรณ์ของแบบจำลอง (lack of fit) แสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งได้พิจารณา

จากค่าสถิติ P มีค่าเท่ากับ 0.981 มีค่ามากกว่า 0.05 ซึ่งค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้มีความสมรूपกับข้อมูล (P-Lack of fit > 0.05) ที่ระดับนัยสำคัญ แบบจำลองที่ได้มีความแม่นยำเพียงพอในการคาดคะเนค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งของถั่งเช่าหิมะ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งได้ (Khajeh and Zadeh. 2012)

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

Source	Sum of squares (SS)	Degree of freedom	Mean squares (MS)	F-value	p-value
Regression	786.881	9	87.431	108.003	0.000 ^a
Residual	40.476	50	0.810		
Total	827.36	59			
Pure error	0.654	45	0.015		
Lack of fit					0.981

โดยที่ SS คือ ผลบวกกำลังสอง (Sum of squares)

df คือ องศาความเป็นอิสระ (Degree of freedom)

F-value คือ สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับความแปรปรวน

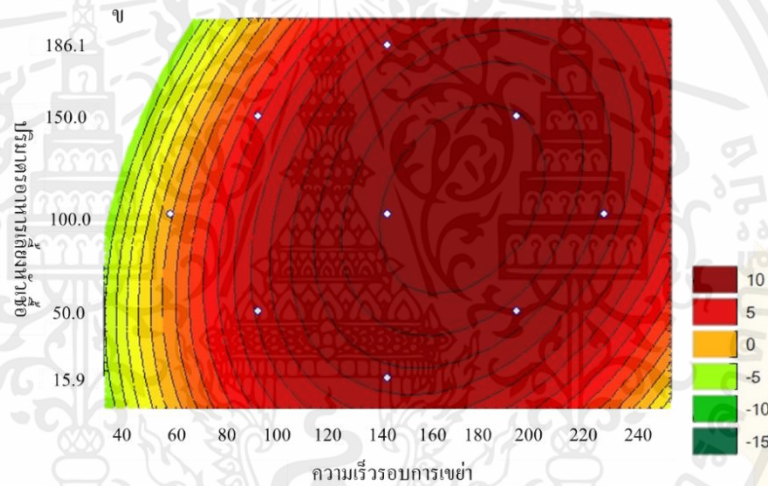
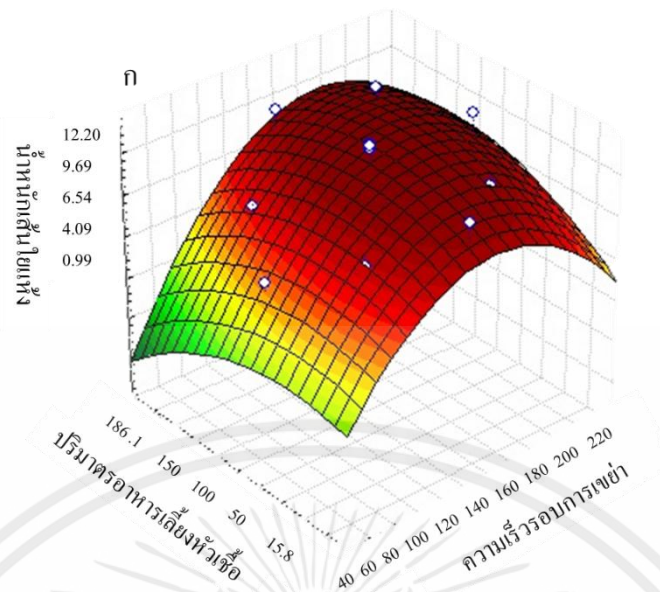
p-value คือ ค่าความน่าจะเป็นที่ระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05

4.2.1.5 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรที่มีต่อน้ำหนักเส้นใยแห้ง

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากสมการที่ (4.2) สามารถนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างปัจจัย 2 ปัจจัย ที่มีผลต่อตัวแปรตามคือค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง ด้วยกราฟ 3 มิติ (surface plot) และกราฟโครงร่าง 2 มิติ (contour plot) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 ดังนี้

1. ผลของความเร็รรอบของการเขย่าและปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

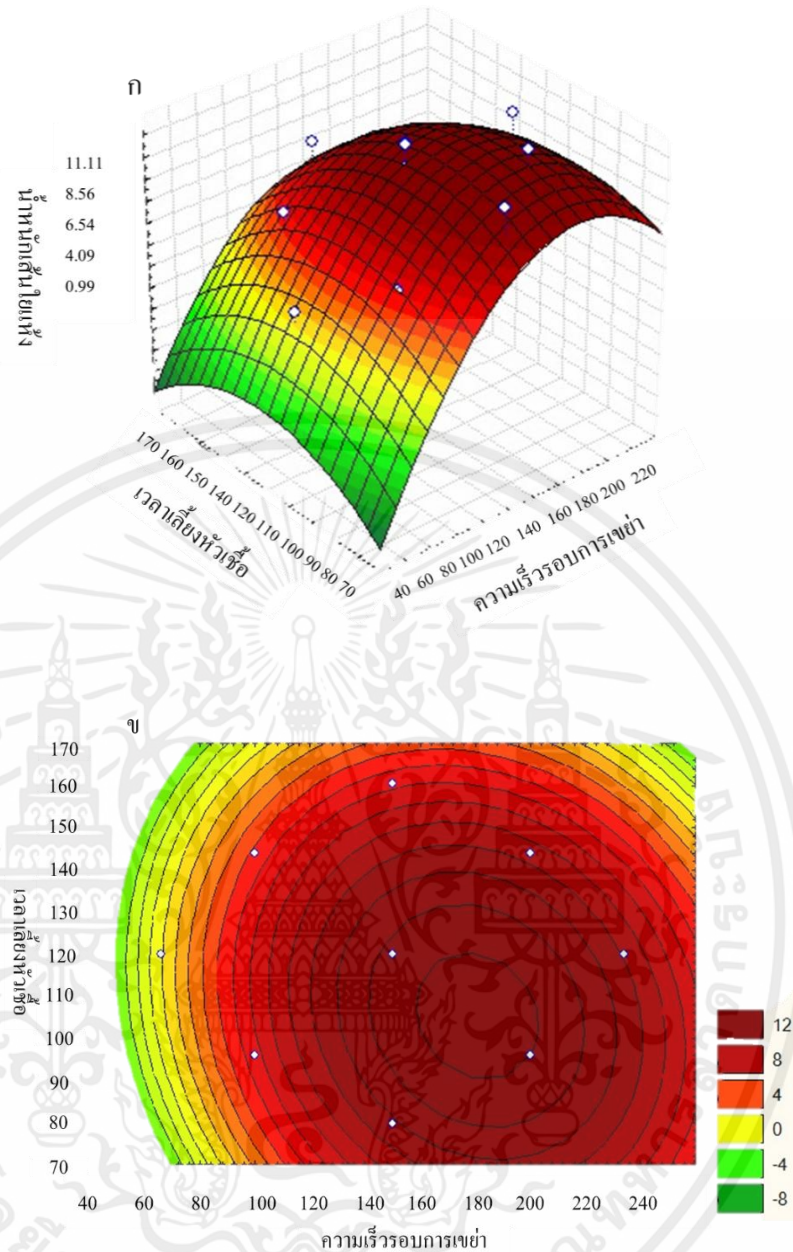
เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเร็รรอบของการเขย่าและปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง แสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่าน้ำหนักเส้นใยแห้งมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตราการเขย่าที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นค่าที่เหมาะสมของตัวแปรต่อน้ำหนักเส้นใยแห้ง รูปที่ 4.2(ก) จะเห็นว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม แสดงว่าทั้งความเร็รรอบของการเขย่าและปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขบวนการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะมีอิทธิพลต่อน้ำหนักเส้นใยแห้ง และรูปที่ 4.2(ข) แสดงส่วนตรงกลางที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด มีค่าความเร็รรอบของการเขย่าประมาณ 180 รอบต่อนาทีและปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 105 มิลลิลิตร ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงที่สุด



รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรและความเร็วรอบของการเขย่าที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง ก) กราฟ 3 มิติ (surface plot) และ ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ (contour plot)

2. ผลของความเร็วรอบของการเขย่าและเวลาในการเลี้ยงหิวเชื้อ

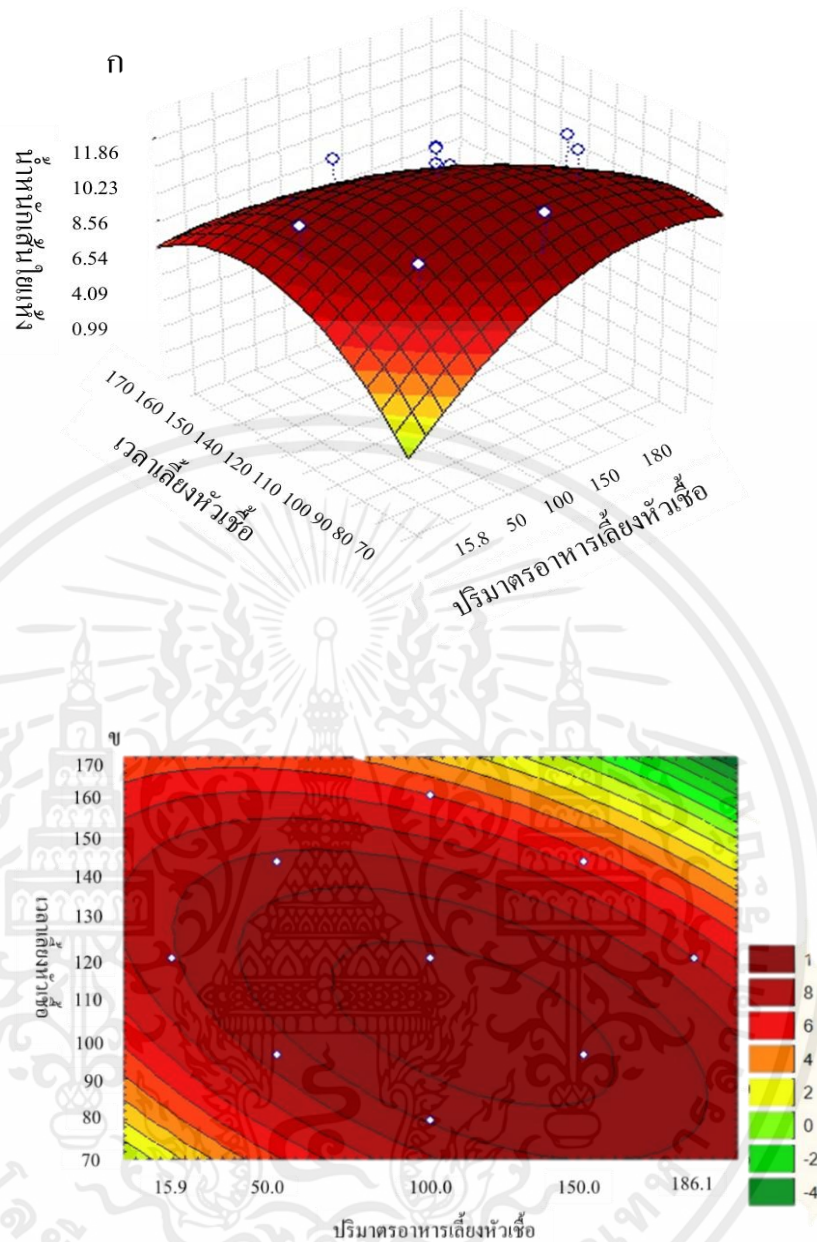
ในรูปที่ 4.3 แสดงอิทธิพลของความเร็วรอบของการเขย่าและเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง รูปที่ 4.3(ก) จะเห็นว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม แสดงว่าทั้งความเร็วรอบของการเขย่าและเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ในขบวนการเพาะเลี้ยงหิวเชื้อเริ่มต้นของถังเช่าหิมะมีอิทธิพลต่อน้ำหนักเส้นใยแห้ง และรูปที่ 4.3(ข) แสดงค่าตรงกลางที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุดมีค่าความเร็วรอบของการเขย่าประมาณ 180 รอบต่อนาทีและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงหิวเชื้อประมาณ 106 ชั่วโมง ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงที่สุด



รูปที่ 4.3 ผลของเวลาในการเลี้ยงเชื้อและความเร็วรอบของการเขย่าที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) กราฟ 3 มิติ (surface plot) และ (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ (contour plot)

3. ผลของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในรูปที่ 4.4 แสดงอิทธิพลของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง รูปที่ 4.4(ก) จะเห็นว่าลักษณะของกราฟเป็นรูปโดม แสดงว่าทั้งเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง และ รูปที่ 4.4(ข) แสดงค่าตรงกลางที่อยู่ในพื้นที่วงกลมวงในสุด มีค่าของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อประมาณ 106 ชั่วโมง และปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 105 มิลลิลิตร ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงที่สุด



รูปที่ 4.4 ผลของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง (ก) กราฟ 3 มิติ (surface plot) และ (ข) กราฟโครงร่าง 2 มิติ (contour plot)

4.2.1.6 การยืนยันผลแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

การยืนยันผลของสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถังเช่าหิมะ ได้คัดเลือกค่าที่ดีที่สุดของแต่ละตัวแปรมาทำการทดลองซ้ำ ซึ่งได้จากกราฟแบบโครงร่างพื้นผิว 3 มิติ ซึ่งทำนายค่า (predict value) ด้วยโปรแกรม STATISTICA เวอร์ชัน 7 ได้เลือกมาทั้งหมด 6 การทดลอง แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การยืนยันผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งกับปัจจัยที่คัดเลือกจากพื้นที่ผิวตอบสนอง

สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			น้ำหนักเส้นใย	น้ำหนักเส้นใย
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	แห้งจากการ คาดคะเน	แห้งจากการ ทดลอง
1	167	105	96	0.348	0.10	-1	13.44	12.63
2	167	105	106	0.348	0.10	-0.58	13.82	13.27
3	180	105	96	0.578	0.10	-1	13.62	13.63
4	180	105	106	0.578	0.10	-0.58	13.93	14.03
5	190	105	96	0.811	0.10	-1	13.51	13.20
6	190	105	106	0.811	0.10	-0.58	13.74	13.29

X_1 คือความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที) X_2 คือปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร) X_3 คือเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ (ชั่วโมง)

สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อถั่งเช่าหิมะที่คำนวณได้จากสมการที่ 4.2 แสดงดังตารางที่ 4.4 จากผลสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะโดยพิจารณาผลจากน้ำหนักเส้นใยแห้ง พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สามารถทำนายผลได้ใกล้เคียงกับผลทดลองจริง และผลของสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะ คือความเร็วรอบในการเขย่า 180 รอบต่อนาที ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 105 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 106 ชั่วโมง ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดที่ 14.03 กรัมต่อลิตร มีสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ R^2 เท่ากับร้อยละ 95.5 และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ adjusted R^2 มีค่าเท่ากับร้อยละ 94.7 นั่นคือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาณอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อจะส่งผลต่อค่าน้ำหนักเส้นใยแห้ง

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นมีจุดประสงค์ เพื่อขยายจนได้ปริมาณเชื้อเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยง เป็นขั้นตอนสำคัญของงานด้านจุลินทรีย์ หัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะต้องอยู่ในระยะเจริญแบบทวีคูณ อายุไม่แก่เกินไป มีปริมาณหนาแน่น และไม่ปนเปื้อนจากเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการ ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อของแต่ละเชื้อจึงมีความสำคัญเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีปริมาณสูงสุดในเวลาที่เหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตามในงานทดลองของ ธัญลักษณ์ ราชพัฒน์ และคณะ, (2559) ได้ศึกษา ระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะในอาหารเหลว PDB เพื่อใช้ผลิตดอกเห็ด พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 เชื้อเราสามารถผลิตเส้นใยได้สูงถึง 22.49 กรัมต่อลิตร โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แต่ได้เลือกระยะเวลาเริ่มต้นของการเพิ่มแบบทวีคูณในชั่วโมงที่ 72 ใน การศึกษาการผลิตดอกเห็ด เนื่องจากระยะเวลาเริ่มต้นของการเพิ่มแบบทวีคูณในระยะนี้เซลล์จะเริ่มแบ่งตัวรวดเร็วและเริ่มสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญจึงเหมาะต่อการใช้เป็นหัวเชื้อที่สุด (Dagley et

al., 1950) อย่างไรก็ตามข้อดีของการเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่มีการผลิตเส้นใยสูงที่สุด จะได้ปริมาณของเซลล์ที่หนาแน่น แข็งแรง สามารถลดระยะเวลาของการสร้างเส้นใยในอาหารแบบแข็งสำหรับการสร้างดอกเห็ด แต่การใช้หัวเชื้อในระยะเริ่มต้นของการเพิ่มเซลล์แบบทวีคูณ จะสามารถประหยัดเวลาและพลังงานในขั้นตอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ

4.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตถึงเข้าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.3.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกเข้าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากเมล็ดข้าวที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ ข้าว ไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวมันปู และข้าวเหนียวดำลิ้มผั่ว โดยใช้เมล็ดข้าว 40 กรัมต่อขวดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 25 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้แสง ได้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

4.3.1.1 ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถึงเข้าหิมะ

วิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถึงเข้าหิมะ โดยการอบแห้งด้วยตู้อบสุญญากาศอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่าแหล่งคาร์บอนจากข้าวไรซ์เบอร์รี่มีน้ำหนักแห้งดอกเห็ดมากที่สุด เท่ากับ 2.16 ± 0.11 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลดังตารางที่ 4.5 รองลงมาคือ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำลิ้มผั่ว และข้าวมันปู น้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเท่ากับ 1.94 ± 0.05 , 1.92 ± 0.08 , 1.75 ± 0.05 และ 1.38 ± 0.05 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด

4.3.1.2 ผลวิเคราะห์สารคอร์โดเซปินและอะดีโนซินจากดอกเห็ดถึงเข้าหิมะ

วิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซินในดอกเห็ดถึงเข้าหิมะจากการเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวมันปู และข้าวเหนียวดำลิ้มผั่ว โดยการใช้วิธี HPLC เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนข้าวเหนียวดำลิ้มผั่วมีปริมาณสารคอร์โดเซปินมากที่สุด เท่ากับ 1.03 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวมันปู ข้าวหอมนิล และข้าวสังข์หยด ซึ่งมีสารคอร์โดเซปินเท่ากับ 0.87 ± 0.01 , 0.79 ± 0.04 , 0.75 ± 0.04 และ 0.71 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้งตามลำดับ ผลของสารอะดีโนซิน พบว่าดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนข้าวเหนียวดำลิ้มผั่วมีปริมาณสารอะดีโนซินสูงสุดเท่ากับ 7.54 ± 0.40 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และรองลงมาคือข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้เท่ากับ 7.52 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ในการค้าหรือการโฆษณาได้

ไม่ว่ากรณีใดก็ตามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.3 ผลวิเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

วิเคราะห์หาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เพาะเลี้ยงบนข้าว 5 ชนิด ได้จากผลต่างของการวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมด กับวิธีดีเอ็นเอส แสดงผลดังตารางที่ 4.5 พบว่าดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนข้าวเหนียวดำลีมฟ์วามีปริมาณความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 0.23 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่ทำการทดลอง โดยปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่เพาะเลี้ยงในข้าวหอมนิล ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวมันปู เท่ากับ 0.14 ± 0.014 , 0.14 ± 0.006 , 0.13 ± 0.007 และ 0.13 ± 0.017 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ

ชนิดแหล่งคาร์บอน	น้ำหนักดอกเห็ดแห้ง	สารคอร์ไดเซปิน	สารอะดีโนซีน	พอลิแซ็กคาไรด์
	กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	2.16 ± 0.11^a	0.87 ± 0.01^b	7.52 ± 0.19^a	0.13 ± 0.007^b
ข้าวสังข์หยด	1.94 ± 0.05^b	0.71 ± 0.04^d	6.18 ± 0.62^b	0.14 ± 0.006^b
ข้าวหอมนิล	1.92 ± 0.08^b	0.75 ± 0.04^{cd}	6.42 ± 0.28^b	0.14 ± 0.014^b
ข้าวมันปู	1.38 ± 0.05^d	0.79 ± 0.04^c	6.47 ± 0.46^b	0.13 ± 0.017^b
ข้าวเหนียวดำลีมฟ์ว	1.75 ± 0.05^c	1.03 ± 0.04^a	7.54 ± 0.40^a	0.23 ± 0.009^a

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

คาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้าง และมีความต้องการทางโภชนาการที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเชื้อราชั้นสูง ทั้งนี้การใช้ประโยชน์ของสารอาหารจากผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร หรือผลิตภัณฑ์พลอยได้ต่างๆ ที่ไม่แพงและมีจำนวนมากนั้น ต่างมีความแตกต่างกันทางคุณค่าโภชนาการ และมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา (Kim and Yun. 2005; Chioza and Ohga. 2013) แม้ว่าสายพันธุ์เชื้อราเดียวกัน แต่การได้รับซับสเตรตจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ก็มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารสำคัญแตกต่างกันไปด้วย จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละชนิด มีผลต่อการเจริญเติบโตของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน จะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ ให้น้ำหนักดอกเห็ดได้มากกว่าข้าวชนิดอื่น แตกต่างจากข้าวเหนียวดำลีมฟ์วเมื่อหุงสุกแล้วลักษณะผิวหน้าอาหารไม่ร่วนซุย เนื่องจากมีอะมิโลแพคตินเป็นส่วนประกอบหลักในแป้งของเมล็ดข้าวมากกว่า ด้วยโครงสร้างที่เป็นกิ่ง มีพันธะไกลโคไซด์ชนิดแอลฟา 1,4 และ 1,6 ทำให้เกิดความเหนียว อาจมีผลต่อการสร้างตุ่ม

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่าไซไ้โก้ มีค่าของน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดมากที่สุด เท่ากับ 1.81 ± 0.03 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด รองลงมาคือ ยีสต์สกัด น้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเท่ากับ 1.78 ± 0.06 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับยีสต์สกัดผสมเปปโตเน (ชุดควบคุม) เปปโตเน กากถั่วเหลืองบด และทริปโตเน มีค่าน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด เท่ากับ 1.61 ± 0.02 1.37 ± 0.06 1.41 ± 0.03 และ 1.35 ± 0.04 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.6

4.3.2.2 ผลวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนจากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

วิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนจากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี HPLC เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า ไซไ้โก้และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ผลิตสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนได้ดีที่สุด เท่ากับ 1.39 ± 0.10 , 1.36 ± 0.007 และ 14.86 ± 1.52 , 14.23 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 4.6

4.3.2.3 ผลวิเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ผลของปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ แสดงผลดังตารางที่ 4.6 พบว่าปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สกัดจากดอกเห็ดจากการเพาะเลี้ยงด้วยไซไ้โก้และยีสต์สกัดในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน มีความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 0.24 ± 0.003 และ 0.23 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ

ชนิดแหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด	สารคอร์ไดเซปิน	สารอะดีโนซีน	สารพอลิแซ็กคาไรด์
		มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง
ยีสต์สกัดผสมเปปโตเน	1.61 ± 0.02^b	0.89 ± 0.08^c	10.50 ± 0.11^c	0.18 ± 0.008^b
ยีสต์สกัด	1.78 ± 0.06^a	1.36 ± 0.07^{ab}	14.23 ± 0.19^a	0.23 ± 0.009^a
เปปโตเน	1.37 ± 0.06^c	0.69 ± 0.10^d	12.31 ± 0.24^{bc}	0.18 ± 0.003^b
ไซไ้โก้	1.81 ± 0.03^a	1.39 ± 0.10^a	14.86 ± 1.52^a	0.24 ± 0.003^a
กากถั่วเหลืองบด	1.41 ± 0.03^c	1.21 ± 0.12^b	11.92 ± 1.36^b	0.15 ± 0.016^b
ทริปโตเน	1.35 ± 0.04^c	0.76 ± 0.01^{cd}	8.11 ± 0.56^d	0.15 ± 0.007^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ไนโตรเจนสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราให้รวดเร็วขึ้น และส่งผลให้แหล่งพลังงานของคาร์บอนหันเหไปสู่การผลิตพลังงานและชีวมวล (Kang *et al.*, 2014) ผลการทดลอง

ข้างต้นพบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Park *et al.*, (2001) ได้ศึกษาการใช้อินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด และพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงถั่งเช่า คือยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเส้นใยได้มากที่สุด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandra *et al.*, (2007) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันที่มีผลต่อการผลิตเส้นใยและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของรา *Lyophyllum decastes* พบว่ายีสต์สกัดให้ผลการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุด 7.03 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ พอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 325 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง และ Das *et al.*, (2010) พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ปริมาณ 93.8 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตสารคอร์โดเซปินได้มากถึง 6.84 กรัมต่อลิตร ราแมลงสามารถใช้อินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่าสารอนินทรีย์ไนโตรเจน กรดอะมิโนที่จำเป็นในอินทรีย์ไนโตรเจนถูกดูดซึมและสังเคราะห์โดยตรง แต่ที่มาจากแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจะยากต่อการสังเคราะห์ในสายพันธุ์ *Cordyceps*

อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นเพิ่มเติมว่า แหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่ มีผลต่อการผลิตของดอกเห็ดและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีเท่ากับแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากยีสต์สกัด อาจเนื่องมาจากไข่ไก่เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของถั่งเช่าหิมะ โดยไข่ไก่ 100 กรัม ให้พลังงาน 143 กิโลแคลอรี โปรตีน 12.8 กรัม ไขมัน 9.51 กรัม และให้แร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญเช่น ฟอสฟอรัส แคลเซียม เหล็ก อุดมไปด้วยวิตามินเอ วิตามินบี (1,2,3,6 และ12) วิตามินดี และวิตามินอี เป็นต้น (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2016) พบรายงานการวิจัยของ ญัฐพงษ์ สิงห์ภูงา (2559) ทำการศึกษาผลของสูตรอาหารต่อการเกิดดอกและการผลิตสารสำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าสูตรอาหารที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่ 10 กรัมต่อลิตร เป็นสูตรอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของดอกเห็ด และมีน้ำหนักสดของดอกเห็ดดีที่สุด 40.98 กรัมต่อขวด และสามารถผลิตสารคอร์โดเซปินได้สูงที่สุดเท่ากับ 479.93 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม ถึงแม้แหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่และยีสต์สกัด ให้ผลผลิตและสารสำคัญทางชีวภาพที่ไม่แตกต่างกัน แต่ด้วยต้นทุนราคาของยีสต์สกัด มีราคาแพงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่มาก ดังนั้นไข่ไก่เหมาะสมที่สุดในการทำการทดลองขั้นตอนถัดไป

4.3.3 ผลการศึกษาการเสริมธาตุโพแทสเซียมที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ได้จาก กล้วยน้ำวัว ฟักทอง น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ เปรียบเทียบกับข้าวโพดอ่อนในชุดควบคุม ได้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

4.3.3.1 ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ผลของน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะจากการเสริมโพแทสเซียมจากน้ำมะพร้าวอ่อน และสูตรเสริมโพแทสเซียมจากกล้วยน้ำว้าสุก เท่ากับ 1.63 ± 0.04 และ 1.62 ± 0.09 กรัมน้ำหนักแห้ง

ต่อขวด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับชุดควบคุม เท่ากับ 1.71 ± 0.14 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด และพบว่า การเสริมธาตุโพแทสเซียมที่ได้จากฟักทองและน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดน้อยสุด เท่ากับ 1.41 ± 0.04 และ 1.30 ± 0.03 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7

4.3.3.2 ผลวิเคราะห์สารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ HPLC เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปริมาณสารคอร์โดเซปิน ในดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ มีการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมจากน้ำมะพร้าวอ่อนและกล้วยน้ำว้าสุก เท่ากับ 0.94 ± 0.11 และ 0.93 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม พบปริมาณสารคอร์โดเซปิน 1.04 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง แต่พบว่าชุดควบคุมมีปริมาณความเข้มข้นของสารอะดีโนซีนมากที่สุด เท่ากับ 12.02 ± 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และมีความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4.7

4.3.3.3 ผลวิเคราะห์สารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์โดยการเสริมธาตุโพแทสเซียม จากน้ำมะพร้าวอ่อน กล้วยน้ำว้าสุก ฟักทอง และน้ำมะพร้าวแก่ แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมจากน้ำมะพร้าวอ่อนสามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 108.91 ± 1.90 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 รองลงมาคือน้ำมะพร้าวแก่ เท่ากับ 89.61 ± 2.01 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และพบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมจาก ฟักทอง กล้วยน้ำว้าสุก และชุดควบคุม เท่ากับ 54.74 ± 2.59 , 51.32 ± 3.55 และ 50.31 ± 3.54 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 4.7 ผลของธาตุโพแทสเซียมที่มีผลต่อการเจริญของดอกเห็ดและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ

ชนิดแหล่งโพแทสเซียม	น้ำหนักแห้งของดอกเห็ด กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด	สารคอร์โดเซปิน	สารอะดีโนซีน	พอลิแซ็กคาไรด์
		มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง
ชุดควบคุม	1.71 ± 0.14^a	1.04 ± 0.11^a	12.02 ± 1.55^a	50.31 ± 3.54^c
น้ำมะพร้าวอ่อน	1.63 ± 0.04^a	0.94 ± 0.11^a	10.19 ± 0.04^b	108.91 ± 1.90^a
กล้วยน้ำว้าสุก	1.62 ± 0.09^a	0.93 ± 0.13^a	9.41 ± 0.44^{bc}	51.32 ± 3.55^c
ฟักทอง	1.41 ± 0.04^b	0.68 ± 0.10^b	9.04 ± 0.76^{cd}	54.74 ± 2.59^c
น้ำมะพร้าวแก่	1.30 ± 0.03^b	0.58 ± 0.01^b	7.61 ± 0.11^d	89.61 ± 2.01^b

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

โพแทสเซียมกระจายอยู่ในอาหารทั่วไปตามธรรมชาติทั้งในพืช สัตว์ เช่น ในถั่ว ธัญพืช ผักใบเขียว เนื้อสัตว์ต่างๆ ผลไม้ต่างๆ เช่น ส้ม กล้วย ลูกพรุน โพแทสเซียมที่อยู่ในอาหารจะอยู่ในรูปเกลือหรือสารประกอบที่ละลายน้ำได้ดี ความสำคัญของธาตุโพแทสเซียม เป็น cofactor ที่สำคัญในกระบวนการ เมแทบอลิซึม จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน โดยในการสะสมไนโตรเจนสำหรับการสร้างโปรตีนจะต้องมีโพแทสเซียมเกี่ยวข้องด้วย ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแป้ง น้ำตาล มีผลต่อการรักษาสมดุลระหว่างประจุบวกและลบ ทำให้ระดับ pH ของเซลล์คงที่ ในการใช้ธาตุโพแทสเซียมของเชื้อราอาจใช้ในรูปแบบของโพแทสเซียมไอออน

รายงานการศึกษาการใช้ธาตุอาหารจากสินค้าการเกษตรโดยตรงมีน้อยมาก ส่วนมากจะศึกษาการใช้ธาตุโพแทสเซียมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราในรูปแบบของสารประกอบ เช่น การเสริมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปริมาณ 4 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำ 400 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps sobolifera* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด (Yang and Zhang, 2016) และการเสริมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps sinensis* UM01 สามารถเพิ่มการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้สูงถึง 486.16 มิลลิกรัมต่อลิตร (Wang et al., 2015)

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาคulture เจริญเติบโตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะเพาะเลี้ยงโดยใช้วัตถุดิบจากทางการเกษตรโดยตรง นอกจากแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมแล้ว ยังมีสารอาหารอื่นๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน เช่น แหล่งวิตามิน แหล่งแร่ธาตุอื่นๆ ได้แก่ ธาตุเหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม แคลเซียม เป็นต้น นอกจากนี้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยของแหล่งอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแล้ว ปริมาณสารสำคัญที่ได้ก็ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมอีกด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของถั่วงาเหิมบนอาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม และบนดักแด้ใหม่ เส้นใยมีสีขาวฟู พบว่าถั่วงาเหิมสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate hypha) และสร้าง conidia มีรูปร่างรี เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ เกิดที่ปลายของเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore) การเจริญของถั่วงาเหิมบนดักแด้ใหม่ ก้านดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อน ความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร กิ่งก้านแตกแขนง มีคอร์นินไดโอสปอร์สีขาวปกคลุมด้านบนสุดของดอก

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่วงาเหิม ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ทำการศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย คือ ความเร็วในการเขย่า ปริมาณอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ มีผลต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ R^2 เท่ากับ ร้อยละ 98.5 และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (adjusted R^2) เท่ากับร้อยละ 94.5 สภาวะที่เหมาะสมจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของปัจจัยที่นำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่วงาเหิม โดยควบคุมอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ดังนี้ ความเร็วในการเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ปริมาณอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เท่ากับ 105 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเท่ากับ 106 ชั่วโมง โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งมากที่สุดเท่ากับ 14.03 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาเหิมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20.0

จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาเหิมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าแหล่งคาร์บอนจากข้าวเหนียวดำลิ้มฟัว โดยใช้เมล็ดข้าว 40 กรัมต่อขวด ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม 60 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยกับ มันฝรั่ง 200 กรัม ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม กลูโคส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เปปโตน 5 กรัมดักแด้ใหม่ 30 กรัม ใน น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร สามารถผลิตสารคอร์ไดเซปิน และสารพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด เท่ากับ 1.03 ± 0.04 และ 0.23 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบว่าสารอะดีโนซีนสร้างได้ดีบนข้าวเหนียวดำลิ้มฟัวและข้าวไรซ์เบอร์รี่ เท่ากับ 7.54 ± 0.40 และ 7.52 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดอกเห็ดถั่วงาเหิมเจริญได้ดีที่สุดบนข้าวไรซ์เบอร์รี่ ผลของน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเท่ากับ 2.16 ± 0.11 กรัม น้ำหนักแห้งต่อขวด

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาเหิมและสาร

ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจากไข่ไก่และยีสต์สกัดในการเพาะเลี้ยงสามารถให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเท่ากับ 1.81 ± 0.03 และ 1.78 ± 0.06 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด สารคอร์ไดเซปินเท่ากับ 1.39 ± 0.10 และ 1.36 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง สารอะดีโนซีน เท่ากับ 14.86 ± 1.52 และ 14.23 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และสารพอลิแซ็กคาไรด์ เท่ากับ 0.24 ± 0.003 และ 0.23 ± 0.009 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาแหล่งแร่ธาตุโพแทสเซียมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยกำหนดความเข้มข้นของโพแทสเซียม 1 กรัมต่อลิตร จากกล้วยน้ำว้า ฟักทอง น้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวแก่ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมจากน้ำมะพร้าวอ่อน และกล้วยน้ำว้า ในอาหารเพาะเลี้ยงถั่วงอก ให้ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเท่ากับ 1.63 ± 0.04 และ 1.62 ± 0.09 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด และสารคอร์ไดเซปิน เท่ากับ 0.94 ± 0.11 และ 0.93 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กับชุดควบคุม ให้ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด เท่ากับ 1.71 ± 0.14 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อขวด และสารคอร์ไดเซปิน เท่ากับ 1.04 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง ยกเว้นสารอะดีโนซีน ในชุดควบคุมสามารถผลิตได้มากที่สุดเท่ากับ 12.02 ± 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง และพบว่าการเสริมธาตุโพแทสเซียมจากน้ำมะพร้าวอ่อน สามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากที่สุด เท่ากับ 108.91 ± 1.90 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือน้ำมะพร้าวแก่ เท่ากับ 89.61 ± 2.01 มิลลิกรัมต่อกรัม/น้ำหนักแห้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาการเจริญเติบโตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่วงอกเพาะเลี้ยงโดยใช้วัตถุดิบจากทางการเกษตรโดยตรง นอกจากแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุโพแทสเซียมแล้วยังมีสารอาหารอื่นๆ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน เช่น แหล่งวิตามิน แหล่งแร่ธาตุอื่นๆ ได้แก่ ธาตุเหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม แคลเซียม เป็นต้น

5.2.2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงถั่วงอกในข้าวไรซ์เบอร์รี่กับข้าวเหนียวกับลิ้มผิวในอัตราส่วนเท่าๆกัน เนื่องจากการผลิตดอกเห็ดบนข้าวไรซ์เบอร์รี่ให้ผลน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดที่สูง และในด้านการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะให้ผลดีในข้าวเหนียวด้าลิ้มผิว

5.2.3 สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงถั่วงอกในรูปแบบการค้า และถั่วงอกมีศักยภาพในการนำไปศึกษาต่อในการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ เช่น ศึกษาในอาหารเสริม เครื่องดื่ม และทางด้านเภสัชกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2561. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.
- จารุวรรณ ฤทธิเดช, ไอยรดา จันทรโสม, ถาวร วินิจสานันท์, หนึ่งฤทัย ธาราวัชรศาสตร์ และ ประภาพรพรรณ ซอหะวัน. 2558. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 46(3): 701-704.
- ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา, พีระศักดิ์ ฉายประสาท และ บุญส่ง แสงอ่อน. 2559. ผลของสูตรอาหารเทียมต่อการเกิดดอกและการผลิตสารสำคัญทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 3(3): 34-46.
- รัฐพล ศรประเสริฐ, อนงค์ หัมพานนท์ และ สยาม อรุณศรีมรกต. 2016. การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืช และ แมลงในท้องถื่นและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*. *Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok*. 26(2): 239-251.
- ณัฐภูมิ สุดแก้ว. 2550. หอมนิล โรสเบอรี่ สีนเหล็ก พันธุ์ข้าวโภชนาการสูง อาหารเลิศค่าและยาเลิศคุณ. *เกษตรกรรมธรรมชาติ*. 10(6): 29-33.
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
- ธัญญาลักษณ์ ราชพัฒน์, ธัญญาภรณ์ การะเวก และ ชีรพงศ์ แก้ววงษ์. 2559. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยชีวมวลและพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*). วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประสิทธิ์ วังภคพัฒน์วงศ์. 2553. โภชนาการของข้าวและนวัตกรรมการใช้ประโยชน์. *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ (วคอก)*. 4(1): 32-40.
- ผาณิต รุจิรพิสิฐ วิชชุดา สังข์แก้ว และเสาวนีย์ เอี้ยวสกุลรัตน์. 2555. คุณค่าทางโภชนาการของข้าว 9 สายพันธุ์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 43(2): 173-176.
- พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์. 2551. เป็บข้าวเหนียวดำแล้วแก่ข้า. หน่วยวิจัยข้าวดำ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- รัตนะ ยศเมธากุล และ ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา. 2561. ผลิตสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งธัญพืช. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 49(1): 168-171.
- วรรณภา เสนาดี, อทิพัฒน์ บุญเพิ่มราศี, วรกัญญา อักษรเนียม และดวงใจ เข้มแดง. 2551. กล้วยผลไม้คุณค่าของทุกคน. *เกษตร*. 32: 70-106.
- วาริช ศรีละออง. 2549. รงควัตถุในข้าวมีความสำคัญอย่างไร. *วารสารจารย์พา*. 14(90); 54-55.

- วิไลวรรณ ทวีศรีศรี, เสรี อยุสสถิตย์, ปริญญา หรุษหิม, ปานหทัย นพชินวงศ. 2554. การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่มีอิทธิพลต่อสุขภาพ ระหว่างมะพร้าว น้ำหอมกับมะพร้าวต้นเดี่ยวพันธ์ต่างๆ. ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน.
- สมศักดิ์ ศิริชัย. 2544. เชื้อราทำลายแมลง. *ชีวปริทรรศน์*. 3(3): 9-12.
- อัญชลี ทองจับใบ. 2553. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรไบโอติกของเชื้อผสมระหว่งแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ โดยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิญญ์ ค่ายชูชีพ. 2554. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนผสมของน้ำสกัดชีวภาพเพื่อเป็นอาหารเสริมในการผลิตถั่วเหลือง. *วารสารสมาคมวิจัย*. 17(1): 112-124.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2550. ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสายพันธุ์ใหม่ ธัญพืชเพื่อสุขภาพ.
- อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่ .
- Abdullah, N.Z., Alshehria, A.B., Khaled, M., Ghanema, C., Saleh, M. and Al-Garni. 2016. Application of a five level central composite design to optimize operating conditions for electricity generation in a microbial fuel cell. *Journal of Taibah University for Science*. 10: 797-804.
- Ahn, Y.J., Park, S.J., Lee, S.G., Shin, S.C. and Choi, D.H. 2000. Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48(7): 2744-2748.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. The Association of Official Analytical.
- Bae, J.T., Sinha, J., Park, J.P., Song, C.H. and Yun, J.W. 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 482-487.
- Ban, K.W., Park, D.K., Shim, J.O., Lee, Y.S., Park, C.H., Lee, J.Y. and Lee, M.W. 1998. Cultural Characteristics for Inducing Fruiting body of *Isaria japonica*. *The Korean Journal of Mycology*. 26(3): 380-386.
- Balon, T.W., Jasman, A.P. and Zhu, J.S. 2002. A fermentation product of *Cordyceps sinensis* increases whole-body insulin sensitivity in rats. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 8(3): 315-323.
- Basith, M. and Madelin M.F. 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. *Canadian Journal of Botany*. 46: 473-480.

- Berne, R.M. 1980. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circulation Research*. 47: 807-813.
- Bhandari, A.K., Negi, J.S., Bisht, V.K., Rana, C.S., Bharti, M.K. and Singh, N. 2010. Chemical constituent, inorganic elements and properties of *Cordyceps sinensis* – a review. *Nature Science*. 8(9): 253-256.
- Bing, M.X., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S. and Jiang Z.J. 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*. 40: 1667-1672.
- Bok, J.W., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H.G. and Towers, G.H.N. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*. 51: 891–898.
- Buenz, E.J., Bauer, B.A., Osmundson, T.W. and Motley, T. J. 2005. The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 19-29.
- Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Srisanoh, U., Choowong, W., Tسانathai, K., Hywel-Jones, N.L., Luangsa-Ard, J.J. and Isaka, M. 2011. Isariotins G-J from cultures of the Lepidoptera pathogenic fungus *Isaria tenuipes*. *Phytochemistry Letters*. 4(3): 283-286.
- Cha, S.H., Lim, J.S., Yoon, C.S., Koh, J.H., Chang, H.I. and Kim, S. W. 2007. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. *Bioresource technology*. 98(1): 165-168.
- Chan, J.S., Barseghyan, G.S., Asatiani, M.D. and Wasser, S.P. 2015. Chemical composition and medicinal value of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of caterpillar medicinal fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 17(7): 649–659.
- Chang, N. Y., Huang, J. C., Lee, C. C., Shih, I. L. and Tzeng, Y. M. 2002. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 889–894.
- Che, J.H., Yun, J. W., Cho, E.Y., Kim, S.H., Kim, Y.S., Kim, W.H., and Kang, B.C. 2014. Toxicologic assessment of *Paecilomyces tenuipes* in rats: Renal toxicity and mutagenic potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 70(2): 527-534.

- Chemists. Inc. : Washington D.C. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escalera, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76(5): 965-977.
- Chen, Y.S., Liu, B.L. and Chang, Y.N. 2011b. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 28: 875-879.
- Chen C, Luo SS, Li Y, Sun YJ, Zhang CK. Study on antioxidant activity of three *Cordyceps* sp. by chemiluminescence. *Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2004;38(7):53-5.
- Chen, X.M., Lu, J.X., Zhang, Y.D., He, J.T., Guo, X.Z., Tian, G.Y. and Jin, L.Q. 2008. Studies of macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43(3): 252-256.
- Chen, C., Bao, H.Y. and Bau, T. 2013. Chemical composition analysis of cultured *Cordyceps militaris*. *Food Science*. 34(11): 36-40.
- Chen, Y., Chen, Y.C., Lin, Y.T., Huang, S.H. and Wang, SM. 2010. Cordycepin induces apoptosis of CGTH W-2 thyroid carcinoma cells through the calcium-calpain-caspase 7-PARP pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(22): 11645-11652.
- Chen, Y. S., Liu, B.L. and Chang, Y.N. 2011. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 28(3): 875-879.
- Chiu, J.H., Ju, C.H., Wu, L.H., Lui, W.Y., Wu, C.W., Shiao, M.S. and Hong, C.Y. 1998. *Cordyceps sinensis* increases the expression of major histocompatibility complex class II antigens on human hepatoma cell line HA22T/VGH cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 26: 159-170.
- Cho, Y.J., Hwang, H.J., Kim, S.W., Song, C.H. and Yun, J.W. 2002. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal of Biotechnology*. 95: 13-23.
- Choi, S., Lim, M.H., Kim, K.M., Jeon, B.H., Song, W.O. and Kim T.W. 2011. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 257: 165-168.

- Chioza, A. and Ohga, S. 2013. Mycelial Growth of *Paecilomyces hepiali* in Various Agar Media and Yield of Fruit Bodies in Rice Based Media. *Advances in Microbiology*. 3: 529-536.
- Cunningham, K.G., Manson, W., Spring, F.S., and Hutchinson, S.S. 1950 Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*. 166: 949.
- Cunningham, K.G., Hutchinson, S.S., Manson, W., and Spring, F.S. 1951. Cordycepin a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization. *Journal of the Chemical Society*. 2299-3200.
- Dagley, S., Dawes, E.A. and Morrison, G.A. 1950. Factors influencing the early phases of growth of *Aerobacter aerogenes*. *Microbiology*. 4(3): 437-447.
- Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakukabara, M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 81(8): 961-968.
- Das, S.K., Masuda, M., Hatashita, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M. 2010. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation. *Process biochemistry*. 45(1): 129-132.
- Dong, C.H., and Yao, Y.J. 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 483-492.
- Dong, J.Z., Lei, C., Zheng, X.J. and Ai, X.R. 2012. Light wavelengths regulates growth and active components of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of Food Biochemistry*. 37(5): 578-584.
- Dong, C.H., Yang, T. and Lian, T.T. 2014. A comparative study of the antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of methanol extracts from fruit bodies and fermented mycelia of caterpillar medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 16(5): 485-495.
- Du, L., Song, J., Wang, H., Li, P., Yang, Z., Meng, L., and Teng, L. 2012. Optimization of the fermentation medium for *Paecilomyces tenuipes* N45 using statistical approach. *African Journal of Microbiology Research*. 6(32): 6130-6141.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.

- Eltzschig, H.K. 2009. Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology*. 111(4): 904-915.
- Ferella, F., Di Celso, G.M., De Michelis, I., Stanisci, V. and Vegliò, F. 2010. Optimization of the transesterification reaction in biodiesel production. *Fuel*. 89(1): 36-42.
- Gu, Y.X., Want, Z.S., Li, S.X. and Yuan, Q.S. 2007. Effects of multiple factors on accumulation of nucleosides and base in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry*. 102: 1304-1309.
- Hamedi, A., Vahid, H., and Ghanati, F. 2007. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polysaccharide by *Agaricus blazei* Murill DPPH 131 using response-surface methodology. *Biotechnology*. 6(4): 456-464.
- Holbein, S., Wengi, A., Decourty, L., Freimoser, F.M. and Jacquier, A. 2009. Cordycepin interferes with 3' end formation in yeast independently of its potential to terminate RNA chain elongation. *RNA*. 15(5): 837-849.
- Holzer, A.M. and Granstein, R.D. 2004. Role of extracellular adenosine triphosphate in human skin. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. 8(2): 90-96.
- Hong, I.P., Nam, S.H., Sung, G.B., Chung, I.M., Hur, H., Lee, M.W., Kim, M.K. and Guo, S.X. 2007. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. *Mycobiology*. 35: 215-218.
- Hong, I.P., Kang, P.D., Kim, K.Y., Nam, S.H., Lee, M.Y., Choi, Y.S., Kim, N.S., Kim, H.K., Lee, L.G. and Humber, R.A. 2010. Fruit Body Formation on Silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 38: 128-132.
- Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X. and Zho, X. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research*. 3(12): 957-961.
- Hung, L.T., Keawsompong, S., Hanh, V.T. and Sivichai, S. 2009. Effect of temperature on cordycepin production in *Cordyceps militaris*. *Thai Journal of Agricultural Science (Thailand)*. 42(4): 219-225.
- Hywel-Jones, N.L. 2001. A review of invertebrate pathogenic Clavicipitaceae of Thailand. *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology*. 34-41.
- Jagger, D.V., Kredich, N.M. and Guarino A.J. 1961. Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by cordycepin. *Cancer research*. 21(2): 216-220.

- Jo, S.J., Lee, T.H., Chae, D.H. and Han, Y.H. 2005. Effect of light conditions on production of cordycepin of *Cordyceps militaris*. *The Korean Journal of Microbiology*. 41(3): 236-238.
- Jung, K., Kim, I.H. and Han D. 2004. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 75-81.
- Kai, Y., Yea, M., Zhoua, Z., Sunb, W. and Linb, X. 2013. The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *Royal Pharmaceutical Society Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65: 474–493.
- Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S. 1996. Polysaccharide in fungi. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F 30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biology and Pharmaceutical Bulletin*. 19: 294-296.
- Kana-uchi, A. and Fukatsu, T. 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience*. 40: 349-351.
- Kang, P.D., Sung, G.B., Kim, K.Y., Kim, M.J., Hong, I.P. and Ha, N.G. 2010. Breeding of a silkworm variety for synnemata production of *Isaria tenuipes*. *Mycobiology*. 38(3):180–183.
- Kang, C., Wen, T.C., Kang, J.C., Meng, Z.B., Li, G.R. and Hyde, K.D. 2014. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture. *The scientific world journal*. 4:1-15
- Kanauchi, A. and Fukatsu, T. 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience*. 40: 349-351.
- Khajeh, M. and Zadeh, F. M. 2012. Response surface modeling of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of benzene, toluene and xylenes in water samples: Box–Behnken design. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 89(1): 38-43.
- Kim, S.W., Xu, C.P., Hwang, H.J., Choi, J.W0, Kim, C.W., and Yun, J.W. 2003. Production and characterization of exopolysaccharides from an enthomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnology Progress*.19 (2): 428-435.
- Kim, K., Kim, H., Han, S., Kim, K., Kwon, J. and Lee, S. 2007. Immunomodulatory effects of CMDB, the component of *Cordyceps militaris* mycelium, by the enhanced production of cytokines in macrophages. *Journal of Immunology*. 178: 64.

- Kim, H.C., Choi, B.S., Sapkota, K., Kim, S., Lee, H.J., Yoo, J.C. And Kim, S.J. 2011. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*. *Process Biochemistry*. 46(8): 1545-1553.
- Kim, S.Y., Shrestha, B., Sung, G.H. and Sung, K.M. 2010. Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiology*. 38: 133-136.
- Kim, H.O. and Yun, J.W. 2005. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of applied microbiology*. 99(4): 728-738.
- Kitakaze, M. and Hori, M. 2000. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure, *Expert Opin. Investig. Drugs*. 9: 2519-2535.
- Klenow, H. 1963. Formation of the mono-, di- and triphosphate of cordycepin in Ehrlich ascites-tumor cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. 76: 347-353.
- Koc, Y., Urbano, A.G., Sweeney, E.B. and McCaffrey, R. 1996. Induction of apoptosis by cordycepin in ADA-inhibited TdT-positive leukemia cells. *Leukemia*. 10: 1019-1024.
- Kodama, E.N., McCaffrey, R.P., Yusa, K. and Mitsuya, H. 2000. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidylm transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*. 59: 273-281.
- Koh, J.B. and Choi, M.A. 2003. Effect of *Paecilomyces japonica* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32: 238-243.
- Kuo, Y.C., Tasi, W.J., Shiao, M.S., Chen, C.F. and Lin, C.Y. 1996. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *The American Journal of Chinese Medicine*. 24: 111-125
- Lan, Y.W., Kit, C.D., Lan, M.J. and Zhao, S.P. 2015. Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 180-185.
- Lee, J.S., Jung, W.C., Park, S.J., Lee, K.E., Shin, W.C. and Hong, E.K. 2013. Culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Paecilomyces japonica* in liquid culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(4): 433-437.

- Lee, J. and Hong S. 2011. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris*. *International Immuno Pharmacological*. 11: 1226-1233.
- Li, C.B., Tong, X.D., Bai, J. and Fan, S.D. 2004. Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*. *Journal of Dalian Nationalities University*. 5.
- Lia, S.P., Yanga, F.Q. and Tsim, Karl W.K. 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis* a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41(5):1571-1584.
- Liang, Z.C., Liang, C.H. and Wu, C.Y. 2014. Various grain substrates for the production of fruiting bodies and bioactive compounds of the medicinal caterpillar mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *International Journal of Medical Sciences. Mushrooms*. 16: 569-578.
- Lin, W.H., Tsai, M.T., Chen, Y.S. and Lai, M.N. 2007. Improvement of sperm production in sub-fertile boar's by *Cordyceps militaris* supplement. *American Journal of Chinese Medicine*. 35(4): 631-641
- Lin, Y.W. and Chiang, B.H. 2008. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of Radix astragali. *Process Biochemistry*. 43: 244-250.
- Liu, J., Yang, S., Yang, X., Chen, Z. and Li, J. 1997. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris*. *Zhongguo Yao Xue Za Zhi*. 22(2): 111-113.
- Liu, X., Huang, K. and Zhou, J. 2014. Composition and Antitumor Activity of the Mycelia and Fruiting Bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2(2):74-79.
- Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S. and Zhong. J.J. 2005. Optimization of carbon source and C: N ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*. 40: 1667-1672.
- Mao, X.B. and Zhong, J.J. 2006 Significant effect of NH₄⁺ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 343-350.
- Mascarin, G.M., Alves, S.B. and Lopes, R.B. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(4): 753-761.

- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31:426-429.
- Mizuno, T., Kinoshita, T., Zhuang, C., Ito, H. and Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-active heteroglycans from Niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. *Bioscience biotechnology and biochemistry*. 59(4); 568-571.
- Montgomery, D. C. 1991. Design and Analysis of Experiments. 3rd ed. John Wiley and Sons., New York.
- Mueller, W.G., Weiler, B.E., Charubala, R., Pflleiderer, W., Leserman, L., Sobol R.W. 1991. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry*. 30: 2027-2033.
- Muller, W.G., Seihard, G., Beyer, R. Breter, H.J., Maidhof, A. and Zahn, R.K. 1977. Effects of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzymes. *Cancer Research*. 37: 3824-3833.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Vining, G. G., Borrer, C. M., and Kowalski, S. M. 2004. Response surface methodology: A retrospective and literature survey. *Journal of Quality Technology*. 36(1): 53-77.
- Nam, K.S. Jo, Y.S. Kim, Y.H. Hyun, J.W. and Kim, H.W. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*. 69: 229-237.
- Overgaard, K.H. 1964. The inhibition of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate formation by cordycepin triphosphate in extracts of Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 80: 504-507.
- Park, Y.H., Moon, E.K., Shin, Y.K., Bae, M.A., Kim, J.G. and Kim, Y.H. 2000. Antitumor activity of *Paecilomyces japonica* is mediated by apoptotic cell-death. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1: 16-20.
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J. and Yun, J.W. 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 76-81.
- Park, J.H, Park, N.S., Lee, S.M. and Park, E. 2011. Effect of Dongchunghacho Rice on Blood Glucose Level, Lipid Profile, and Antioxidant Metabolism in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Food Science and Biotechnology*. 20(4): 933-940.
- Penman, S., Rosbash, M. and Penman, N. 1970. Messenger and heterogenous nuclear

- RNA in HeLa cells: differential inhibition by cordycepin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 67: 1878-1885.
- Radwan, M. AND Wilson, H.R. 1980. The Structure of Cordycepin. *Acta crystallographica section B*. 36: 2185.
- Ramesh, T., Yoo, S.K., Kim, S.W., Hwang, S.Y., Sohn, S.H., Kim, I.W. and Kim, SK. 2012. Cordycepin (3'- deoxyadenosine) attenuates age-related oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in rats. *Experimental Gerontology*. 47: 979-987.
- Ribeiro, J.A. 1995. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacology and toxicology*. 77(5): 299-305
- Rottman, F. and Guarino A.J. 1964. The inhibition of phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase activity by cordycepin monophosphate. *Biochimica et Biophysica Acta*. 89: 465-468.
- Sarrai, AE., Hanini, S., Merzouk, NK., Tassalit, D., Szabó, T., Hernádi, K. and Nagy, L. 2016. Using central composite experimental design to optimize the degradation of tylosin from aqueous solution by photo-Fenton reaction. *Materials* 9(6): 1-11.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and allied *Hyphomycetes*. *Studies in Mycology*. 6:119-119.
- Shashidhar, M.G., Giridhar, P., Sankar, U.K. and Manohar, B. 2013. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review. *Journal of Functional Foods*. 5(3): 1013-1030.
- Shin, K. H., Lim, S. S., Lee, S. H., Lee, Y. S., and Cho, S. Y. 2001. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of Cordyceps. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 928: 261-273.
- Shin, K. H., Lim, S. S., Lee, S., Lee, Y. S., Jung, S. H., and Cho, S. Y. 2003. Anti-tumour and immuno-stimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*. *Phytotherapy Research*. 17: 830-833.
- Shih, L., Tsai, K. L. and Hsieh, C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), 193-201.
- Shin, S., Kim K.J. and Lee, S. 2009. Cordycepin Suppresses Expression of Diabetes Regulating Genes by Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Macrophages. *Immune Network*. 98: 1598.

- Sone, Y., Okuda, R. and Wada, N. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 2641-2653.
- Song, J.F., Li, D.J. and Liu, C.Q. 2009. Response surface analysis of microwave-assisted extraction of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84(11): 1669-1673.
- Sugar, A.M. and McCaffrey, R.P. 1998. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(6): 1424-1427.
- Sung, J.M., Choi, Y.S and Lee, H.K. 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Korean Journal of Medical Mycology*. 27: 15-19.
- Sung, J.M., Choi, Y.S., Shrestha, B. and Park, Y.J. 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Korean journal of mycology*. 30: 6-10.
- Sung, G.H., Shrestha, B., Han, S. K., Kim, S. Y. and Sung, J.M. 2010. Growth and cultural characteristics of *Cordyceps cardinalis* collected from Korea. *Mycobiology*. 38(4): 274-281.
- Supothina, S., Srisanoh, U., Nithithanasilp, S., Tasanathai, K., Luangsa-Ard, J.J., Li, C.R., & Isaka, M. 2011. Beauvericin production by the Lepidoptera pathogenic fungus *Isaria tenuipes*: Analysis of natural specimens, synnemata from cultivation, and mycelia from liquid-media fermentation. *Natural products and bioprospecting*. 1(3): 112-115.
- Suraporn, S., Sangsuk, W., Chanhan, P. and Promma, S. 2015. Effects of probiotic bacteria on the growth parameters of the Thai silkworm, *Bombyx mori*. *Thai Journal of Agricultural Science*. 48(1): 29-33.
- Thanapoom, M., Wirat, V., Chaiyaporn, P. and Vichien, K. 2010. Optimization of Lactic Acid Production by Pellet-Form *Rhizopus oryzae* in 3-L Airlift Bioreactor Using Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161:137-146.
- Toda, N., Okunishi, H., Taniyama, K., and Miyazaki, M. 1982. Responses to adenine nucleotides and related compounds of isolated dog cerebral, coronary and mesenteric arteries. *Journal of Vascular Research*. 19(5): 226-236.

- Tuli, H.S., Sharma, A.K., Sandhu, S.S. and Kashyap, D. 2013. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Science*. 93: 863-869.
- Tuli, H. S., Sharma, A. K., and Sandhu, S. S. 2014. Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. *The Journal of Biological Chemistry*. 1: 35-47.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2016. สืบค้นวันที่: 15 มิถุนายน พ.ศ. 2517 จาก <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/01123?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=raw+egg&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=>
- Vetvika, V., Dvorak, B., Vetvickova, J., Richter, J., Krizan, J., Sima, P. and Yvin, J.C. 2007. Orally administered marian (1,3)-Beta-D-Glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 40(4): 291-298.
- Wang, Y., Fang, X., An, F., Wang, G. and Zhang, X. 2011. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microbial cell factories*. 10(1): 98.
- Wang, B.S., Lee, C.P., Chen, Z.T., Yu, H.M. and Duh, P.D. 2012. Comparison of the hepatoprotective activity between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis*. *Journal of Functional Foods*. 4 (2): 489-495.
- Wang, L.Y., Cheong, K.L., Wu, D.T., Meng, L.Z., Zhao, J. and Li, S.P. 2015. Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 180-185.
- Wang, J., Kan, L., Nie, S., Chen, H., Cui, S.W. and Phillips, A.O. 2015. A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. *Food Science and Technology*. 63(1): 2-7.
- Wen, T.C., Kang, J.C., Lei, B.X., Li, G.R. and He, J. 2008. Effects of different solid culture condition on fruit body and cordycepin output of *Cordyceps militaris*. *Guizhou Agricultural Sciences*. 36(4): 92-94.
- Wu, Z.L., Wang, X.X. and Cheng, W.Y. 2000. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL. *Cell Biochemistry Function*. 18: 93-97.

- Wu, D.T., Xie, J., Wang, L.Y., Ju, Y.J., Lv, G.P., Leong, F., Zhao, J. and Li, S.P. 2014. Characterization of bioactive polysaccharides from *Cordyceps militaris* produced in China using saccharide mapping. *Journal of Functional Foods*. 9: 315-323.
- Won, S.Y. and Park, E.H. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 555-561.
- Xiao, J.H. and Zhong, J.J. 2007. Secondary metabolites from *Cordyceps* species and their antitumor activity studies. *Recent Patents on Biotechnology*. 1: 123-137.
- Xiao, Y., Xing, G., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M. and Dong M. 2014. Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of Functional Foods*. 10: 210-222.
- Xu, C.P., Sinha, J., Bae, J.T., Kim, S.W., and Yun, J. W. 2006. Optimization of physical parameters for exo-biopolymer production in submerged mycelial cultures of two entomopathogenic fungi *Paecilomyces japonica* and *Paecilomyces tenuipes*. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 501-506.
- Xu, C.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Choi, J.W. and Yun, J.W. 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelia growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochemistry*. 38: 1025-1030.
- Yang, S. and Zhang, H. 2016. Optimization of the fermentation process of *Cordyceps sobolifera* Se-CEPS and its anti-tumor activity in vivo. *Journal of Biological Engineering*. 10: 1-9.
- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Watanabe, J. and Uchiyama, H. 1997. Preparation and anti-HIV activity of low-molecular weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 32: 51-55.
- Yamanaka, K. Inatomi, S. and Hanaoka M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience*. 39: 43-48.
- Yi, Z.L., Huang, W.F., Ren, Y., Onac, E., Zhou, G.F., Peng, S. and Li, H.H. 2014. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*. 175: 139-143.
- Yin, H. Qiao, C. Qin, S. Tang, W. and Jia, S. (2013). Optimization of fermentation Medium for *Cordyceps sinensis*. *Food Reserice and Deverlopment*. 34: 5-8.
- Yoo, H.S., Shin, J.W., Cho, J.H., Son, C.G., Lee, Y.W., Park, S.Y., et al. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth.

Acta Pharmacologica Sinica. 25: 657-665.

- Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. 2004. Antitumour activity of cordycepin in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 31: 51–53
- Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. and Kunitoma M. 2007. Cordycepin and *Cordyceps sinensis* reduce the growth of human promyelocytic leukaemia cells through the Wnt signalling pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34(1): 61-63.
- Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L. and Zhang, H. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia*. 75: 465-472.
- Yu, R.M., Yang, W., Song, L.Y., Yan, C.Y., Zhang, Z. and Zhao, Y. 2007. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*. 70: 430–436.
- Zhan, Y., Dong, C.H. and Yao, Y.J. 2006. Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* in vitro. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 1365–1370.
- Zhen, Y.Z., Xiao, C.L., Ya, L.T., Feng, Y.D., Hui, Q., Sun, L. and Chen, Y.M. 2016. Effects of cultural medium on the formation and antitumor activity of polysaccharides by *Cordyceps gunnii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 11: 1-5.
- Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. and Tang, K. 2009. Cordyceps fungi: Natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 61: 279-291.
- Zhu, J.S., Halpern, G.M., and Jones, K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 4: 289-303.
- Zhu, Z.Y., Liu, X.C., Tang, Y.L., Dong, F.Y., Sun, H.Q., Chen, L. and Zhang, Y.M. 2016. Effects of cultural medium on the formation and antitumor activity of polysaccharides by *Cordyceps gunnii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 122: 494-498.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก1. อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDA เสริม

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	15	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยต้มมันฝรั่งดิบ 200 กรัม และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 20 นาที กรองน้ำต้มด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม กลูโคส 10 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม, เปปโตน 5 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม คนให้เข้ากันเทใส่ขวดรูปชมพู่ ปิดจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

ก2. อาหารเลี้ยงหัวเชื้อ PDB เสริม

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยต้มมันฝรั่งดิบ 200 กรัม และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 20 นาที กรองน้ำต้มด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม กลูโคส 10 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม, เปปโตน 5 กรัม คนให้เข้ากันเทใส่ขวดรูปชมพู่ ปิดจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

ก3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม

มันฝรั่ง	200	กรัมต่อลิตร
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	20	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
หนอนไหม	30	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังสงวนลิขสิทธิ์และสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยต้มมันฝรั่งดิบ 200 กรัม และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 20 นาที กรองน้ำต้มด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เติมหกทูโคส 20 กรัม, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม และหนอนไหมบด 30 กรัมคนให้เข้ากัน

ก4. การเตรียมอาหารแข็งในการทดสอบแหล่งคาร์บอน

การเตรียมเมล็ดข้าวในการทดสอบแหล่งคาร์บอน โดยซังเมล็ดข้าวแต่ละชนิด 40 กรัม ลงในขวดแก้วปากกว้าง 16 ออนซ์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร x สูง 14 เซนติเมตร) จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม ปริมาตร 60 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นปิดฝา และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทดสอบ

ก5. การเตรียมอาหารแข็งในการทดสอบแหล่งไนโตรเจน

ซังเมล็ดข้าวที่ได้รับคัดเลือกจากหัวข้อ 3.5.2 40 กรัม ลงในขวดแก้ว จากนั้นนำแหล่งไนโตรเจนที่จะทำการทดสอบ คือ ยีสต์สกัด เปปโตน ไซโก่ กากถั่วเหลืองบด และทริปโตน กำหนดปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม โดยเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนในชุดควบคุม คือ ยีสต์สกัดผสมเปปโตน ในหัวข้อที่ 3.5.2 จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริมที่เตรียมได้ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เทลงในขวด ปิดฝาและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทดสอบ

ก6. การเตรียมอาหารแข็งในการทดสอบแหล่งโพแทสเซียม

เตรียมเมล็ดข้าวที่ได้รับการคัดเลือก โดยซัง 40 กรัม ลงในขวดแก้ว จากนั้นเตรียมแหล่งโพแทสเซียมที่ใช้ทดสอบคือ ฟักทอง กล้วยน้ำว่า น้ำมะพร้าวอ่อน น้ำมะพร้าวแก่ ที่คำนวณปริมาณของธาตุโพแทสเซียม 1 กรัมต่อลิตรไว้แล้ว

โดยฟักทองและกล้วยน้ำว่า จะต้มร่วมกับมันฝรั่งดิบ 200 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 20 นาที กรองน้ำต้มด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เติมหกทูโคส 20 กรัม และดักแด้ไหมบด 30 กรัม และในส่วนของน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ จะนำน้ำต้มมันฝรั่ง ที่ผสมหกทูโคส 20 กรัม และดักแด้ไหมบด 30 กรัม มาผสมกับน้ำมะพร้าวอ่อนและน้ำมะพร้าวแก่ ให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแหล่งไนโตรเจนที่ได้คัดเลือกจากข้อที่ 3.5.3 ลงไปในอาหารแต่ละสูตร และใช้อาหารเหลวที่เตรียมได้ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เทลงในขวด ปิดฝาและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ผล

ข1. การหาน้ำหนักเส้นใยแห้งของถั่วงอกแช่หิมะ (ดัดแปลงจาก A.O.A.C. 1995)

1.1 นำหลอดเซนตริฟิวส์อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้องนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

1.2 เก็บตัวอย่างเซลล์ในอาหารที่ใช้ทดลอง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10000 g เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง

1.3 นำหลอดเซนตริฟิวส์อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

1.4 นำหลอดเซนตริฟิวส์ใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำมาคำนวณผลดังนี้

น้ำหนักเส้นใยแห้ง = น้ำหนักหลอดที่มีตะกอนเซลล์หลังอบ - น้ำหนักหลอดเปล่าหลังอบ

ข2. การทำแห้งดอกเห็ดถั่วงอกแช่หิมะ

2.1 เก็บตัวอย่างดอกเห็ดถั่วงอกแช่หิมะแต่ละขวด เมื่อครบ 25 วัน หลังจากให้แสง

2.2 เก็บเฉพาะส่วนของดอกไม่รวมฐาน ใส่ลงในภาชนะที่ทราบค่าแล้ว

2.3 นำไปทำแห้งด้วย เครื่องอบร้อนสุญญากาศ 20 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักคำนวณค่าหาน้ำหนักแห้งดอกเห็ด (กรัมต่อขวด)

ข3. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC. 1995)

3.1 อบอุ่นสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก

3.2 ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับหาความชื้นที่ทราบน้ำหนัก นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3 ชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก 30 นาทีจนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกผลและนำไปคำนวณผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลง $M = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$ เจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไป 2.6

โดยที่ M = ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)
 W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ
 W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

ข4. การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-เบส (<http://globethailand.ipst.ac.th>)

4.1 ชั่งตัวอย่างข้าว 10 กรัม และบดให้พอละเอียดลงในบีกเกอร์เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนข้าว: น้ำ เท่ากับ 1:1

4.2 ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างนาน 30 วินาที แล้วพักทิ้งไว้ 3 นาที ทำอย่างนี้ 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนข้าวในบีกเกอร์ตกตะกอนจะเห็นน้ำใสๆ อยู่บริเวณด้านบน

4.3 วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ลงไปในบริเวณน้ำใสๆ อย่าจุ่มลงไปให้โดนตะกอนด้านล่าง รอจนค่าหยุดนิ่ง แล้วอ่านค่าพีเอช

4.4 เมื่อวัดค่าพีเอชเสร็จแล้วใช้น้ำกลั่นล้างตัววัดพีเอชบริเวณส่วนที่สัมผัสกับตัวอย่างให้สะอาด แล้วใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง

ข5. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารคอร์โคเซปินและอะดีโนซีน

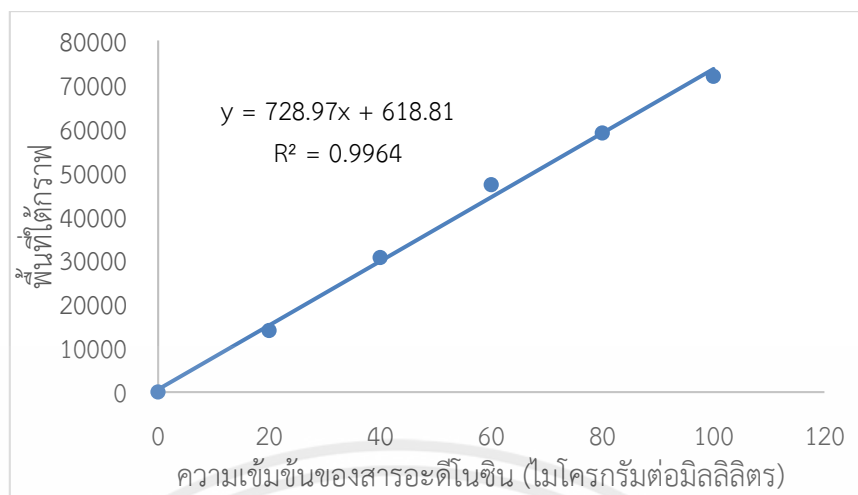
5.1 การสกัดตัวอย่าง (ตัดแปลงจาก Wang *et al.*, 2015)

ชั่งดอกเห็ด สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงอัตราส่วน 1:10 (w/v) ภายใต้อุปกรณ์เขย่าเสียงความถี่สูงควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส 40 นาที กรองสารสกัดผ่านเมมเบรนฟิวเตอร์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารทั้งสองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m) ใช้น้ำบริสุทธิ์สูงต่อเมทานอล อัตราส่วน 85:15 (v/v) เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาตรของตัวอย่างที่ทดสอบ 1 ไมโครลิตร และทำการวิเคราะห์โครมาโตแกรมที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Wang *et al.*, 2015)

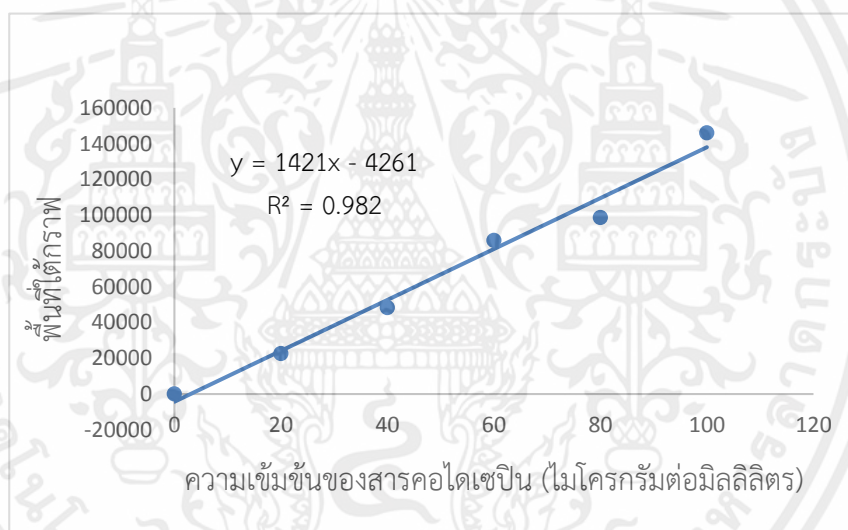
5.2 การสร้างกราฟมาตรฐานคอร์โคเซปินและอะดีโนซีน

ทำการชั่งสารมาตรฐานคอร์โคเซปินและอะดีโนซีน 0.002 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์สูง 2 มิลลิลิตรแล้วทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสกรองผ่านเมมเบรนฟิวเตอร์ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงในขวดแก้วฉีกตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารมาตรฐานด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC) และนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานคอร์โคเซปิน และอะดีโนซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้งานในเชิงการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดก็ตาม ห้ามนำไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร



รูปที่ ข2 กราฟมาตรฐานของคอโคเดเซปินที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ข6. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois et al. 1956)

6.1 การเตรียมสารละลายฟินอลความเข้มข้นร้อยละ 5

ชั่งฟินอล 2.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

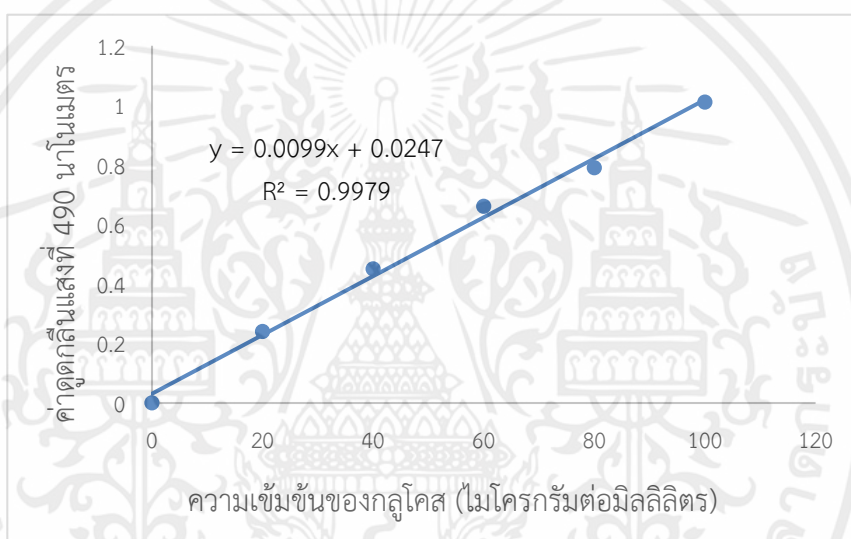
6.2 วิธีการ

เอกลสารนี้เป็นเอกลสารที่สร้างขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ทำการเจือจางตัวอย่างตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับน้ำกลั่น
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม อีกทั้งห้ามให้บุคคลเบี่ยงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำ ไปใช้
จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟินอลร้อยละ
ละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10

นาที่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

6.3 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายกลูโคสแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วเติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ข3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ข7. การเตรียมสาร 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (Miller, 1959)

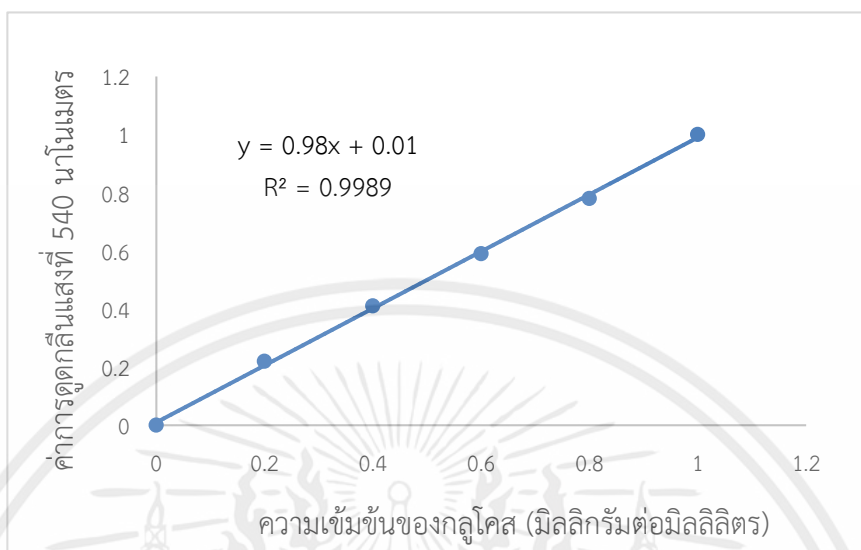
7.1 อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. คิวเวต (cuvette)
3. ปิเปต (pipette)

7.2 การเตรียมสาร 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)

เตรียมโดยการชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ละลาย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle

salt; $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดแก้วสีขาที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ ข4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสโดยวิธีกรด 3,5 ดีไนโตรซาลิกไซคลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างและการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

ตารางที่ ข1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคส มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)
1	0.0	1.00	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลบางประการ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารเรทุกครั้งที่มีการนำ ไปใช้

7.3.1 วิธีการ

1. เปปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS 3.0 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือด 5 นาทีหลังจากนั้นแช่ในน้ำเย็นทันที
4. เติมน้ำกลั่นลงไป 6 มิลลิลิตร
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 540 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

ข8. การคำนวณจำนวนสิ่งทดลองและระดับปัจจัยที่ใช้เป็นตัวแปรอิสระในการทดลองด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง

จำนวนสิ่งทดลองสามารถคำนวณได้จาก (ไพโรจน์, 2544)

$$N = 2^k + 2k + r$$

กำหนดให้

N คือ จำนวนสิ่งทดลอง

K คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

r คือ จำนวนซ้ำของค่ากลาง

ตัวอย่างคำนวณจำนวนสิ่งทดลองแทนค่าลงในสมการที่ 3

$$N = 2^3 + 2(3) + 6$$

$$N = 8 + 6 + 6$$

$$N = 20$$

ระดับปัจจัยสามารถคำนวณได้จากค่า α ซึ่งเป็นระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง (0) ดังนี้ (Mason และ คณะ, 2003)

$$\alpha = F^{1/4}$$

กำหนดให้

α คือ ระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง

F คือ จำนวนจุดของการออกแบบการทดลองแบบ 2^n แฟคทอเรียล

n คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณค่า α แทนค่าในสมการที่ 4

$$\alpha = (2^3)^{1/4}$$

$$\alpha = 8^{1/4}$$

$$\alpha = 1.682$$

ตัวอย่างการคำนวณของระดับปัจจัยเวลา

กำหนดระดับปัจจัยกลาง (0) เท่ากับ 120 ชั่วโมง ระดับปัจจัยสูง (+1) เท่ากับ 144 ชั่วโมง ระดับปัจจัยต่ำ (-1) เท่ากับ 96 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นระยะห่างจากจุดกึ่งกลาง 0 ถึง +1 และ -1 มีระยะห่างเท่ากับ 24 ชั่วโมง

ดังนั้น ที่ระยะห่าง 1 จะมีค่าเท่ากับ 24

ที่ระยะห่าง 1.682 จะมีค่าเท่ากับ $24 \times 1.682 = 40.368$

1

ดังนั้น ระดับปัจจัยสูงสุด (+1.682) จะเท่ากับ $120 + 40.368 = 160.37$

ระดับปัจจัยต่ำสุด (- 1.682) จะเท่ากับ $120 - 40.368 = 79.63$

ข9. วิธีการคำนวณหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนในวัตถุดิบ

ใช้หลักการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารโดยวิธี Kjeldahl Method ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีน ค่า 6.25 คือปริมาณโปรตีนที่มีไนโตรเจนอยู่ 1 กรัม หรือ ปริมาณโปรตีน 100 กรัม จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยเฉลี่ยประมาณ 16 กรัม ดังนั้นเมื่อทราบค่าของโปรตีนในอาหารสามารถคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนได้ดังนี้

9.1 การคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนของยีสต์สกัดกับเปปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริม

โดย ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เสริมใช้ยีสต์สกัดกับเปปโตนชนิดละ 5 กรัมต่อลิตร

เปปโตน 100 กรัม

มีไนโตรเจน 15.6 กรัม

ถ้าใช้เปปโตน 5 กรัม

จะมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.78 กรัม

ยีสต์สกัด 100 กรัม

มีไนโตรเจน 11.1 กรัม

ถ้าใช้ยีสต์สกัด 5 กรัม

จะมีไนโตรเจนเท่ากับ 0.56 กรัม

ดังนั้นยีสต์สกัดกับเปปโตน ชนิดละ 5 กรัมมีจำนวนไนโตรเจนเท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตร

9.2 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนในไข่ไก่ (ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบอ้างอิงข้อมูลจาก: USDA

Nutrient database)

โปรตีน 100 กรัมในอาหาร

มีไนโตรเจน 16 กรัม

ไข่ไก่ 100 กรัม มีโปรตีนเท่ากับ 12.56 กรัม

จะมีไนโตรเจน 2.01 กรัม

ดังนั้น ไนโตรเจน 2.01 กรัม

ใช้ไข่ไก่ 100 กรัม

ถ้าต้องการไนโตรเจน 1.34 กรัม

จะต้องใช้ไข่ไก่ 66.67 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม

9.3 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองบด (ปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบอ้างอิงข้อมูลจาก บ. ธนากร น้ำมันพืช จ. สมุทรปราการ)

โปรตีน 100 กรัมในอาหาร	มีไนโตรเจน 16 กรัม
กากถั่วเหลือง 100 กรัม	
มีโปรตีนเท่ากับ 50 กรัม	ดังนั้นมีไนโตรเจนเท่ากับ 8 กรัม

ดังนั้น ไนโตรเจน 8 กรัม	พบในกากถั่วเหลือง 100 กรัม
ถ้าต้องการไนโตรเจน 1.34 กรัม	จะต้องใช้กากถั่วเหลือง 16.75 กรัมต่อลิตร

9.4 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนในเปปโติน

ไนโตรเจน 15.6 กรัม	ได้จากเปปโติน 100 กรัม
ถ้าต้องการไนโตรเจน 1.34 กรัม	จะต้องใช้เปปโตินเท่ากับ 8.59 กรัมต่อลิตร

9.5 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนในยีสต์สกัด

ไนโตรเจน 11.1 กรัม	ได้จากยีสต์สกัด 100 กรัม
ถ้าต้องการไนโตรเจน 1.34 กรัม	จะต้องใช้ยีสต์สกัดเท่ากับ 12.07 กรัมต่อลิตร

9.6 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนในทรีปโติน

ไนโตรเจน 13.9 กรัม	ได้จากทรีปโติน 100 กรัม
ถ้าต้องการไนโตรเจน 1.34 กรัม	จะต้องใช้ทรีปโตินเท่ากับ 9.64 กรัมต่อลิตร

ข10. การคำนวณปริมาณการใช้วัตถุดิบจากฟักทอง กลัวยน้ำว่า น้ามะพร้าวอ่อน และ น้ามะพร้าวแก่ สำหรับการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียม 1 กรัมต่อลิตร

10.1 ปริมาณโพแทสเซียม 1 กรัมในฟักทอง (ปริมาณโพแทสเซียมในวัตถุดิบอ้างอิงข้อมูลจาก: USDA Nutrient database)

ธาตุโพแทสเซียม 340 มิลลิกรัม	ได้จากฟักทอง 100 กรัม
ต้องการธาตุโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัม	ต้องใช้ฟักทองเท่ากับ 294 กรัมต่อลิตร

10.2 ปริมาณโพแทสเซียม 1 กรัมในกลัวยน้ำว่าสุก (ปริมาณโพแทสเซียมในวัตถุดิบอ้างอิงข้อมูลจาก: USDA Nutrient database)

ธาตุโพแทสเซียม 358 มิลลิกรัม	ได้จากกลัวยน้ำว่าสุก 100 กรัม
ต้องการธาตุโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัม	ต้องใช้กลัวยน้ำว่าสุกเท่ากับ 279 กรัมต่อลิตร

10.3 ปริมาณโพแทสเซียม 1 กรัมในน้ามะพร้าวอ่อน (Satyavati Krishnankutty, 1987 อ้างโดย วิไลวรรณ ทวีศรี, 2550)

ธาตุโพแทสเซียม 290 มิลลิกรัม	ได้จากน้ามะพร้าว 100 กรัม
------------------------------	---------------------------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่นใดได้
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม ผู้จัดทำขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการธาตุโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัม ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเท่ากับ 345 กรัมต่อลิตร

10.4 ปริมาณโพแทสเซียม 1 กรัมในน้ำมะพร้าวแก่ (Satyavati Krishnankutty, 1987 อ้าง
โดย วิไลวรรณ ทวีศรี, 2550)

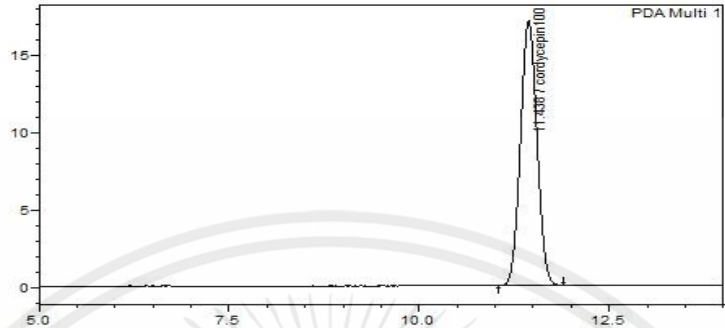
ธาตุโพแทสเซียม 247 มิลลิกรัม ได้จากน้ำมะพร้าวแก่ 100 กรัม

ต้องการธาตุโพแทสเซียม 1000 มิลลิกรัม ใช้น้ำมะพร้าวแก่เท่ากับ 405 กรัมต่อลิตร

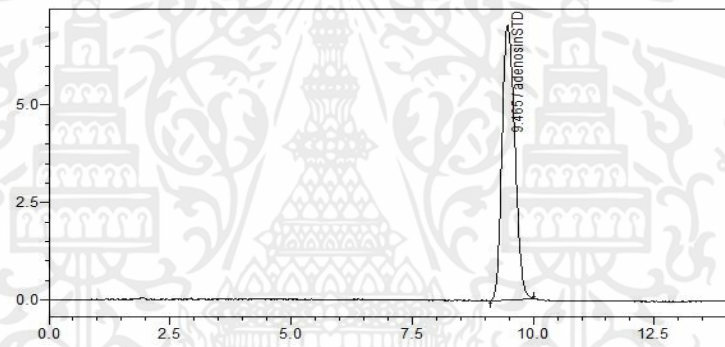


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

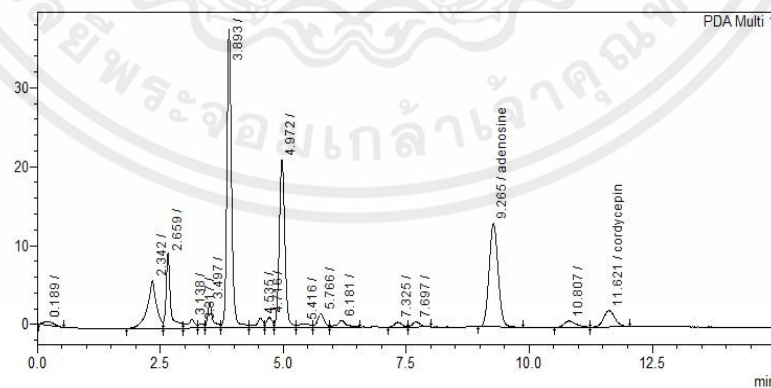
ภาคผนวก ค
รูปการทดลอง



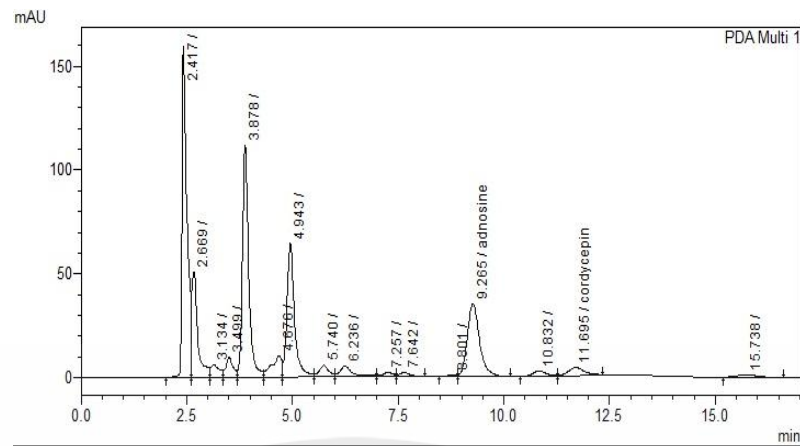
รูปที่ ค1 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารมาตรฐานคอร์โดเซปิน ในนาที่ที่ 11.436 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



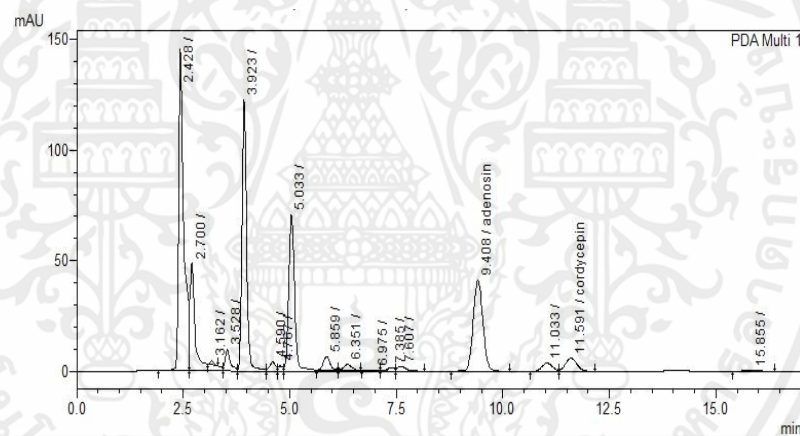
รูปที่ ค2 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารมาตรฐานอะดีโนซีน ในนาที่ที่ 9.465 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



รูปที่ ค3 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างที่สกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เพาะเลี้ยงบนข้าวเหนียวดำลิมพูในศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (1) คือ พีทของสารอะดีโนซีนในนาที่ที่ 9.265 และ (2) พีทของสารคอร์โดเซปินในนาที่ที่ 11.621 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

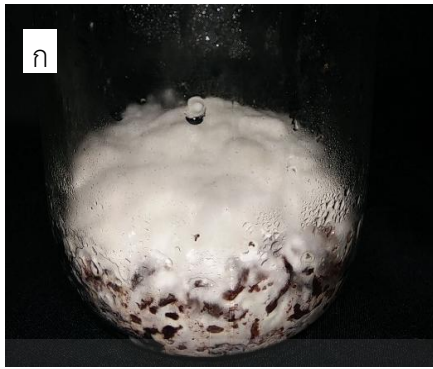


รูปที่ ค4 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างในศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (1) คือ พีทของสารอะดีโนซีนโดยใช้ไขไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงในนาที่ที่ 9.265 และ (2)พีทของสารคอร์ไดเซปินโดยใช้ไขไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงในนาที่ที่ 11.695 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



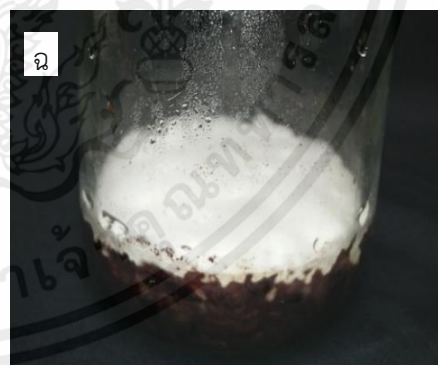
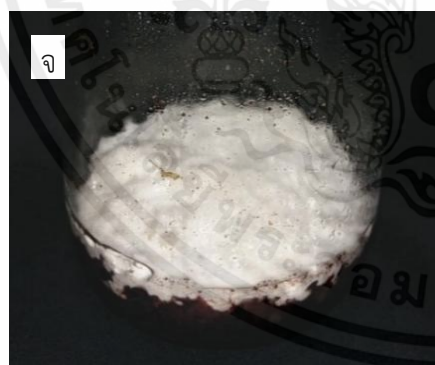
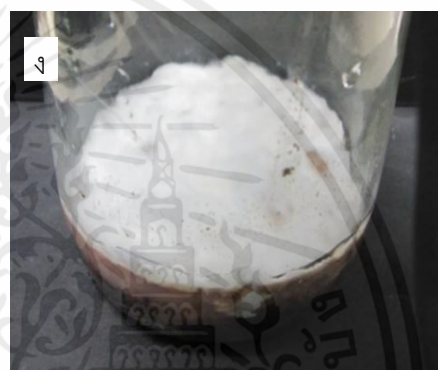
รูปที่ ค5 โครมาโทแกรมแสดงลักษณะพีทของสารตัวอย่างในศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (1) คือ พีทของสารอะดีโนซีนโดยใช้ไขไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงในนาที่ที่ 9.2458 และ (2)พีทของสารคอร์ไดเซปินโดยใช้ไขไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงในนาที่ที่ 11.235 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค6 ลักษณะเส้นใยของถั่งเช่าหิมะที่เจริญบนเมล็ดข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (ก) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ข) ข้าวหอมนิล (ค) ข้าวมันปู (ง) ข้าวสังข์หยด (จ) ข้าวเหนียวดำลิ้มผ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



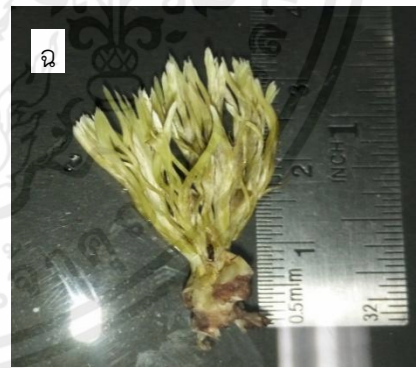
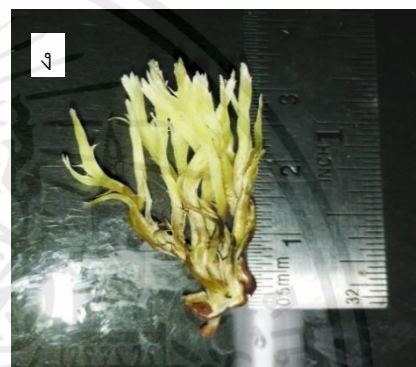
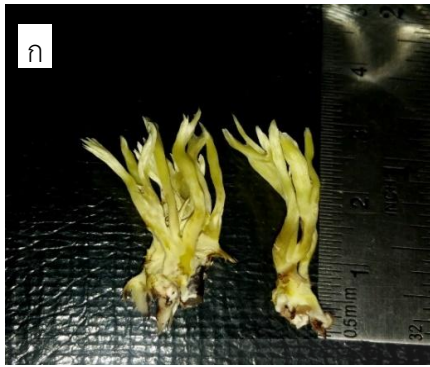
รูปที่ ๓7 ลักษณะการเจริญของเส้นใยถ้ำเหิมที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียว
 ดำลิ้มผั่ว (ก) ยีสต์สกัดผสมเปปโตนิไซท์ (ชุดควบคุม) (ข) ยีสต์สกัด (ค) เปปโตนิ (ง) ไซท์
 (จ) กากถั่วเหลืองบด (ฉ) ทรีปโตนิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๘ ลักษณะดอกเห็ดถึงเข้าหิมะเจริญบนเมล็ดข้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (ก) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ข) ข้าวสังข์หยด (ค) ข้าวหอมนิล (ง) ข้าวมันปู (จ) ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๙ ลักษณะดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียวดำลิ้มผ้า
 (ก) ยีสต์สกัดผสมเปปโตไนไข่ไก่ (ข) ยีสต์สกัด (ค) เปปโตไน (ง) ไข่ไก่ (จ) กากถั่วเหลืองบด
 (ฉ) ทริปโตไน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑๑ ลักษณะดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เสริมด้วยแหล่งโพแทสเซียมเจริญบนเมล็ดข้าวเหนียวดำลิ้ม
ฝัว (ก) ชูดควบคุม (ข) น้ำมะพร้าวอ่อน (ค) ฟักทอง (ง) น้ำมะพร้าวแก่ (จ) กลัวยน้ำว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลวิเคราะห์ค่าสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ง1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Carbon of adenosine	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
rice berry rice	3	7.5267	.19035	.10990
luem pua glutinous rice	3	7.5467	.40004	.23096
Munpoo rice	3	6.4767	.47057	.27168
Homnine rice	3	6.4267	.28042	.16190
sungyong rice	3	6.1867	.62324	.35983
Total	15	6.8327	.70054	.18088
Model				
Fixed Effects			.42066	.10861
Random Effects				.29158

ตารางภาคผนวกที่ ง2 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Carbon of adenosine	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.101	4	1.275	7.207	.005
Within Groups	1.770	10	.177		
Total	6.870	14			

ตารางภาคผนวกที่ ง3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
sungyong rice	3	6.1867	
Homnine rice	3	6.4267	
Munpoo rice	3	6.4767	
rice berry rice	3		7.5267
luem pua glutinous rice	3		7.5467
Sig.		.439	.955

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon of cordycepin	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
rice berry rice	3	.8717	.01266	.00731
luem pua glutinous rice	3	1.0377	.04843	.02796
Munpoo rice	3	.7913	.04216	.02434
Homnine rice	3	.7527	.04070	.02350
sungyong rice	3	.7123	.04497	.02596
Total	15	.8331	.12373	.03195
Model				
Fixed Effects			.03990	.01030
Random Effects				.05750

ตารางภาคผนวกที่ ง5 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.198	4	.050	31.149	.000
Within Groups	.016	10	.002		
Total	.214	14			

ตารางภาคผนวกที่ ง6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon of cordycepin	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
sungyong rice	3	.7123			
Homnine rice	3	.7527	.7527		
Munpoo rice	3		.7913		
rice berry rice	3			.8717	
luem pua glutinous rice	3				1.0377
Sig.		.244	.263	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุผลเบี่ยงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon of polysaccharide	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
rice berry rice	3	.1310	.00721	.00416
luem pua glutinous rice	3	.2327	.00987	.00570
Munpoo rice	3	.1287	.01790	.01033
Homnine rice	3	.1353	.01484	.00857
sungyong rice	3	.1360	.00693	.00400
Total	15	.1527	.04272	.01103
Model	Fixed Effects		.01215	.00314
	Random Effects			.02003

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.024	4	.006	40.771	.000
Within Groups	.001	10	.000		
Total	.026	14			

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon of polysaccharide	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Munpoo rice	3	.1287	
rice berry rice	3	.1310	
Homnine rice	3	.1353	
sungyong rice	3	.1360	
luem pua glutinous rice	3		.2327
Sig.		.506	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

carbon of fruiting body	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
rice berry rice	3	2.1633	.15567	.08988
luem pua glutinous rice	3	1.7500	.05000	.02887
Munpoo rice	3	1.3867	.05132	.02963
Homnine rice	3	1.9233	.08021	.04631
sungyong rice	3	1.9400	.05292	.03055
Total	15	1.8327	.27796	.07177
Model			.08786	.02269
				.12939

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.004	4	.251	32.529	.000
Within Groups	.077	10	.008		
Total	1.082	14			

ตารางภาคผนวกที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่งเช่าหิมะและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Carbon of fruiting body	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Munpoo rice	3	1.3867			
luem pua glutinous rice	3		1.7500		
Homnine rice	3			1.9233	
SangYong rice	3			1.9400	
rice berry rice	3				2.1633
Sig.		1.000	1.000	.821	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง13 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

adenosine by nitrogen source	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
yeast extract + peptone	3	10.5095	.11799	.06812
yeast ex	3	14.2361	.19717	.11384
peptone	3	12.3184	.24311	.14036
Egg	3	14.8652	1.52589	.88097
tryptone	3	8.1121	.86520	.49953
soybean meal	3	11.9257	1.36988	.79090
Total	18	11.9945	2.45061	.57761
Model	Fixed Effects		.91882	.21657
	Random Effects			1.01084

ตารางภาคผนวกที่ ง14 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

adenosine	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	91.963	5	18.393	21.786	.000
Within Groups	10.131	12	.844		
Total	102.093	17			

ตารางภาคผนวกที่ ง15 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของอะดีโนซีนของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Nitrogen source	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
tryptone	3	8.1121			
yeast extract + peptone	3		10.5095		
soybean meal	3		11.9257	11.9257	
peptone	3			12.3184	
yeast ex	3				14.2361
Egg	3				14.8652
Sig.			.083	.610	.418

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง16 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Nitrogen source of cordycepin	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
yeast extract+peptone	3	.8978	.08049	.04647
yeast ex	3	1.3623	.07228	.04173
peptone	3	.6983	.10138	.05853
Egg	3	1.3908	.10860	.06270
tryptone	3	.7623	.01023	.00591
soybeanmeal	3	1.2108	.12686	.07324
Total	18	1.0537	.29775	.07018
Model	Fixed Effects		.09126	.02151
	Random Effects			.12504

ตารางภาคผนวกที่ ง17 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.407	5	.281	33.791	.000
Within Groups	.100	12	.008		
Total	1.507	17			

ตารางภาคผนวกที่ ง18 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของคอร์โดเซปินของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Nitrogen source of cordycepin	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
peptone	3	.6983			
tryptone	3	.7623	.7623		
yeast extract+peptone	3		.8978		
soybean meal	3			1.2108	
yeast ex	3			1.3623	1.3623
Egg	3				1.3908
Sig.		.407	.094	.065	.709

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง19 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

nitrogen source of polysaccharide	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
yeast extract+peptone	3	.1790	.00866	.00500
yeast ex	3	.2347	.00945	.00546
peptone	3	.1797	.00351	.00203
Egg	3	.2370	.00361	.00208
tryptone	3	.1460	.00794	.00458
soybean meal	3	.1533	.01662	.00960
Total	18	.1883	.03768	.00888
Model			.00939	.00221
				.01602
			Fixed Effects	
			Random Effects	

ตารางภาคผนวกที่ ง20 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.023	5	.005	52.364	.000
Within Groups	.001	12	.000		
Total	.024	17			

ตารางภาคผนวกที่ ง21 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารพอลิแซ็กคาไรด์ของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงาและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

nitrogen source of polysaccharide	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
tryptone	3	.1460		
soybean meal	3	.1533		
yeast extract+peptone	3		.1790	
peptone	3		.1797	
yeast ex	3			.2347
Egg	3			.2370
Sig.		.358	.932	.766

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง22 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Nitrogen source of fruiting body	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
yeast extract + peptone	3	1.6157	.02650	.01530
yeast ex	3	1.7827	.06824	.03940
peptone	3	1.3743	.06252	.03609
Egg	3	1.8197	.03044	.01757
tryptone	3	1.3543	.04644	.02681
soybean meal	3	1.4093	.03453	.01994
Total	18	1.5593	.20085	.04734
Model			.04751	.01120
				Random Effects
				.08555

ตารางภาคผนวกที่ ง23 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.659	5	.132	58.367	.000
Within Groups	.027	12	.002		
Total	.686	17			

ตารางภาคผนวกที่ ง24 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Nitrogen source of fruiting body	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
tryptone	3	1.3543		
peptone	3	1.3743		
soybean meal	3	1.4093		
yeast extract + peptone	3		1.6157	
yeast ex	3			1.7827
Egg	3			1.8197
Sig.		.202	1.000	.359

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ภาคผนวกที่ ง25 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารอะดีโนซีนของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of adenosine	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Banana	3	9.4173	.44686	.25799
brown coconut water	3	7.6116	.11543	.06664
young coconut water	3	10.1949	.04799	.02771
pumpkin	3	9.0487	.76091	.43931
Control baby corn	3	12.0265	1.55443	.89745
Total	15	9.6598	1.64680	.42520
Model			.80132	.20690
				.72510

ตารางภาคผนวกที่ ง26 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารอะดีโนซีนของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.546	4	7.887	12.282	.001
Within Groups	6.421	10	.642		
Total	37.967	14			

ตารางภาคผนวกที่ ง27 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารอะดีโนซีนของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of adenosine	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
brown coconut water	3	7.6116		
pumpkin	3	9.0487	9.0487	
Banana	3		9.4173	
young coconut water	3		10.1949	
Control baby corn	3			12.0265
Sig.		.053	.125	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง28 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารคอร์ไดเซปินของการศึกษา การเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและ การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of cordycepin	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Banana	3	.9275	.13442	.07761
brown coconut water	3	.5800	.01108	.00640
young coconut water	3	.9418	.11471	.06623
pumpkin	3	.6789	.10620	.06131
Control baby corn	3	1.0447	.11202	.06467
Total	15	.8346	.20185	.05212
Model				
Fixed Effects			.10505	.02712
Random Effects				.08757

ตารางภาคผนวกที่ ง29 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของสารคอร์ไดเซปินของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและ การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.460	4	.115	10.422	.001
Within Groups	.110	10	.011		
Total	.570	14			

ตารางภาคผนวกที่ ง30 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สารคอร์ไดเซปินของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและ การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of cordycepin	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
brown coconut water	3	.5800	
pumpkin	3	.6789	
Banana	3		.9275
young coconut water	3		.9418
Control baby corn	3		1.0447
Sig.		.276	.221

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ 34 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและผลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of fruiting body	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Banana	3	1.6333	.09074	.05239
brown coconut water	3	1.3033	.03512	.02028
young coconut water	3	1.6233	.04041	.02333
pumpkin	3	1.4200	.04583	.02646
Control baby corn	3	1.7133	.10504	.06064
Total	15	1.5387	.16835	.04347
Model			.06962	.01798
			Fixed Effects	
			Random Effects	.07619

ตารางภาคผนวกที่ 35 ค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Fruiting body	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.348	4	.087	17.966	.000
Within Groups	.048	10	.005		
Total	.397	14			

ตารางภาคผนวกที่ 36 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของดอกเห็ดแห้งของการศึกษาการเสริมแร่ธาตุโพแทสเซียมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถั่วงอกและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Potassium sources of fruiting body	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
brown coconut water	3	1.3033	
pumpkin	3	1.4200	
young coconut water	3		1.6233
Banana	3		1.6333
Control baby corn	3		1.7133
Sig.		.067	.161

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว ศันสนีย์ ภู่ประกิจ
วัน เดือน ปีเกิด	21 พฤษภาคม 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	69 หมู่ 5 ต.ยางงาม อ.หนองไผ่ จ. เพชรบูรณ์ 67220
ประวัติการศึกษา	(2553) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา เกรตเฉลี่ย 2.40 มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก
ผลงานวิชาการ	ปี 2560 จัดโปสเตอร์เสนอผลงานวิทยานิพนธ์ เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงถึงเข้าหิมะโดยใช้วิธีพื้นผิวดูดซับของ ไนงาน ประชุมวิชาการระดับชาติ นเรศวรวิจัยครั้งที่ 13 วิจัย และนวัตกรรม ขับเคลื่อนเศรษฐกิจและสังคม เมื่อวันที่ 20-21 กรกฎาคม 2560 ณ อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้