ผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน

EFFECT OF DIFFERENT SUBSTRATES AND CASING MATERIALS ON THE GROWTH OF MILKY MUSHROOM (*Calocybe indica*)

ศศิวิมล เฉลยบุญ
ศศิวิมล ทองหงส์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน

EFFECT OF DIFFERENT SUBSTRATES AND CASING MATERIALS ON THE GROWTH OF MILKY MUSHROOM (*Calocybe indica*)

ศศิวิมล เฉลยบุญ
ศศิวิมล ทองหงส์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

EFFECT OF DIFFERENT SUBSTRATES AND CASING MATERIALS ON THE GROWTH OF MILKY MUSHROOM (*Calocybe indica*)

SASIWIMOL CHALOEYBOON
SASIWIMON THONGHONG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน Effect of different substrates and casing materials on the growth of milky mushroom (*Calocybe indica*)
ชื่อนักศึกษา	นางสาวศศิวิมล เฉลยบุญ รหัสนักศึกษา 57050898 นางสาวศศิวิมล ทองหงส์ รหัสนักศึกษา 57050899
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานกรรมการ	
รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการ	
ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน

ชื่อนักศึกษา นางสาวศศิวิมล เฉลยบุญ รหัสนักศึกษา 57050898

นางสาวศศิวิมล ทองหงส์ รหัสนักศึกษา 57050899

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเห็ดหิมาลัย *Calocybe indica* นี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเพาะปลูกให้ได้ดอกเห็ดที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์พร้อมทั้งวิเคราะห์ผลทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยการเพาะปลูกระหว่างวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน วัสดุปลูกมี 6 ชนิดได้แก่ ฟางข้าว ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย หยวกกล้วย ฟางข้าวผสมใบไผ่ ใบไผ่ หยวกกล้วยผสมใบไผ่ วัสดุคลุมผิวมี 2 ชนิด คือ สูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน และสูตร B ที่มีมูลไส้เดือนเป็นองค์ประกอบ เพาะภายใต้สภาวะควบคุมด้วยอุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-85 โดยรวบรวมผลการทดลองการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ฟางข้าวสูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน ให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติดีที่สุด ได้แก่ วันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง 16.33 วัน ความยาวของก้านดอก 15.12 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด 11.30 เซนติเมตร น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด 54.09 กรัม ค่าประสิทธิภาพการผลิต 13.53 เปอร์เซ็นต์ และค่า IC50 10.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฟางข้าวสูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือนให้ค่าที่ดีที่สุดในเชิงพาณิชย์ เห็ดหิมาลัยเจริญได้ดีในอุณหภูมิและความชื้นที่ใกล้เคียงกับประเทศไทย จึงเหมาะแก่การนำมาเพาะปลูกในประเทศอย่างมาก

คำสำคัญ: การเพาะปลูก, วัสดุคลุมผิว, วัสดุปลูก, เห็ดหิมาลัย

Title	Effect of different substrates and casing materials on the growth of milky mushroom (*Calocybe indica*)
Students	Miss Sasiwimol Chaloeyboon Student ID 57050898 Miss Sasiwimon Thonghong Student ID 57050899
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Asst.Prof.Mongkol Phensaijai

Abstract

The aim of this milky mushroom, *Calocybe indica*, research was studied the cultivation methods of the mushroom growing completely and analyzed the physical, chemical and antioxidant effects by planting between different substrate materials and casing materials. There are six types of substrate materials: paddy straw, paddy straw mixed with banana stalk, banana stalk, paddy straw mixed with bamboo leaves, bamboo leaves and banana stalk mixed with bamboo. There are two types of casing materials: Formula A without vermicompost and Formula B with vermicompost composition. All treatments were controlled conditions with temperature of 30-38°C and relative humidity 80-85%. The results of statistical analysis showed that paddy straw in formula A without vermicompost gave the best statistical analysis, including the date of spawn run was 16.33 days, the length of stalk was 15.12 cm., the pileus diameter was 11.30 cm., the fresh mushroom yield was 54.09 g. , the productivity was 13.53 % and IC50 values was 10.63 mg/ml. The paddy straw in formula A without vermicompost gave the best commercial value. Milky mushrooms grow very well in temperature and humidity close to Thailand. It is suitable for cultivation in the country.

Keyword: cultivation, casing materials, substrates materials, milky mushroom

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษากับการวิจัยทดลองในครั้งนี้ ตลอดจนแนะนำแนวทางในการแก้ไข ปรับปรุง และขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.วีนา ชูโชติ ประธานคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจทาน แก้ไข ปรับปรุง อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ได้ช่วยตรวจแก้ไข คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ จนโครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ สุจิตรา สุคนธมัต ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาการใช้งานโปรแกรม SPSS และโปรแกรม Minitab ในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่คอยสนับสนุน ให้คำปรึกษา และคอยให้กำลังใจในการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา นักศึกษาปริญญาโท เพื่อนๆ ทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ ที่คอยช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำปรึกษา ให้กำลังใจในการทำการศึกษาวิจัยมาโดยตลอดรวมทั้งมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ศศิวิมล เฉลยบุญ

ศศิวิมล ทองหงส์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เห็ดหิมาลัย 3
2.1.1 โครงสร้างและลักษณะทั่วไปของเห็ดหิมาลัย 4
2.1.2 การจัดจำแนกของเห็ด 4
2.1.3 คุณค่าทางอาหารของเห็ด 6
2.2 วัสดุปลูก 6
2.3 วัสดุคลุมผิว 7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเห็ด 7
2.4.1 สภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเห็ด 7
2.4.2 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตเห็ด 8
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ 8
2.5.1 กลุ่มของอนุมูลอิสระ 9
2.5.2 ผลกระทบของการเกิดอนุมูลอิสระ 10
2.5.3 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ 11
2.5.4 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14

3.1 ขั้นตอนการแยกเชื้อเห็ดหิมาลัยบริสุทธิ์ 15

3.1.1 แยกสปอร์จากดอกเห็ดหิมาลัย 15

3.1.2 แยกก้านจากดอกเห็ดหิมาลัย 15

3.2 การเพิ่มจำนวนเส้นใยเห็ดหิมาลัย 15

3.2.1 วิธีการผลิตเชื้อข้าวฟ่าง 15

3.2.2 การผลิตวัสดุคลุมผิวด้านบนก้อนเชื้อเห็ด 17

3.3 การเพาะให้ออกดอก 17

3.4 การเก็บเกี่ยวผลผลิต 18

3.5 วิเคราะห์และประเมินคุณภาพผลผลิต 18

3.5.1 การวัดและประเมินผลทางกายภาพ 18

3.5.2 การวัดและประเมินผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม 19

3.5.3 การวัดและประเมินผลความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธีDPPH 20

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 22

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 27

5.1 สรุปผลการวิจัย 27

5.2 ข้อเสนอแนะ 27

เอกสารอ้างอิง 28

ภาคผนวก 33

ภาคผนวก ก 34

ภาคผนวก ข 36

ภาคผนวก ค 38

ภาคผนวก ง 39

ภาคผนวก จ 40

ภาคผนวก ฉ 42

ภาคผนวก ช 46

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง 9

2.2 วิธีการวิเคราะห์ต่างๆในการประเมินความสามารถในต้านอนุมูลอิสระ 12

3.1 ตารางแสดงชนิดของจำนวนหน่วยทดลอง 15

3.2 ตารางแสดงสูตรที่ใช้ผลิตวัสดุคลุมผิว 17

3.3 ตารางแสดงวัสดุปลูก วัสดุคลุมผิวสูตร A และสูตร B 17

4.1 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุงโดยไม่มีวัสดุคลุมผิว $P<0.05$ 22

4.2 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ ด้วยวิธีทางสถิติที่วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวมีอิทธิพลร่วมกัน $P<0.05$ 23

4.3 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูล-อิสระ ด้วยวิธีทางสถิติที่วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวไม่มีอิทธิพลร่วมกัน และวัสดุคลุมผิวไม่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ $P>0.05$ โดยวัสดุปลูกมีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ $P<0.05$ 24

4.4 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูล-อิสระของวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิว ชนิดฟางข้าว สูตร A ที่ไม่ได้มีมูลไส้เดือนที่มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพาะ *Calocybe indica* 26

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 เห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) 3

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันในประเทศไทยนิยมบริโภคเห็ดหลากหลายชนิดมากขึ้นด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่มีอยู่มากโดยเฉพาะโปรตีน เห็ดส่วนใหญ่ที่คนไทยนิยมบริโภค อาทิเช่น เห็ดฟาง เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดเหล่านี้ให้คุณค่าทางสุขภาพที่ดีเยี่ยมเป็นอาหารที่ปราศจากไขมัน แคลอรีต่ำ มีใยอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ เสริมสร้างภูมิต้านทานแถมยังมีปริมาณโซเดียมหรือเกลือน้อยมากอีกด้วย เหมาะอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่ร่างกายอ่อนแอหรือกำลังลดน้ำหนัก และสามารถนำมาประกอบอาหารรับประทานได้หลากหลายเมนู จึงทำให้หลายคนต่างติดใจในเมนูเห็ดอย่างมากมาย

เห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) เป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่น่าสนใจแก่ผู้พบเห็น ด้วยรูปลักษณ์ที่ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ สีขาวนวล ได้รับรายงานครั้งแรกจากรัฐเบงกอลตะวันตก ประเทศอินเดีย (Purakayastha and Chandra, 1974) โดยเห็ดสายพันธุ์นี้ง่ายต่อการเพาะปลูก ขั้นตอนของการปลูกไม่ซับซ้อน เพราะสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและเศษวัสดุเกษตรอินทรีย์ซึ่งหาได้ง่าย มีอุปกรณ์สำหรับการดำเนินการเพาะปลูกน้อย ทำให้การเพาะเห็ดหิมาลัยนั้นลงทุนน้อย ขายได้ราคาสูงกว่าเห็ดทั่วไป เนื่องจากดอกเห็ดใหญ่ เนื้อแน่นจึงทำให้มีน้ำหนักมาก และดอกเห็ดมีอายุการเก็บรักษานาน ใช้เวลาน้อยในการเจริญเติบโตน้อย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะภูมิอากาศร้อนชื้นใกล้เคียงกับภูมิอากาศในประเทศไทย เห็ดหิมาลัยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30-38 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-85 และมีคุณค่าทางโภชนาการที่น่าสนใจ เป็นแหล่งโปรตีนที่ถูกที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่รับประทานอาหารเพื่อสุขภาพ เช่นเดียวกับเห็ดท้องถิ่นที่เป็นที่นิยมในประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการหาวิธีเพาะปลูกที่มีประสิทธิภาพ ได้ดอกเห็ดที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์สามารถใช้วัสดุปลูกเหลือทิ้งทางการเกษตรและเศษวัสดุเกษตรอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ด้วยการหาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธีของ (Jones, J.B.Jr, 1991) ดัดแปลงจาก AOAC., 1995 รวมทั้งคุณสมบัติความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Barros *et. al.*, 2008) ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเพาะปลูกจากวัสดุที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย โดยคำนึงถึงปริมาณของผลผลิตที่จะได้รับเป็นสำคัญ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อให้ทราบผลของวิธีการเพาะปลูกให้ได้ดอกเห็ดที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ด้วยวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวเหลือทิ้งทางการเกษตรและเศษวัสดุเกษตรอินทรีย์ที่แตกต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) เพื่อให้ทราบผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของเห็ดหิมาลัย

3) เพื่อให้ทราบผลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเห็ดหิมาลัย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่แตกต่างกัน โดยมีวัสดุปลูกคือ ฟางข้าว ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย หยวกกล้วย ฟางข้าวผสมใบไผ่ ใบไผ่ และ หยวกกล้วยผสมใบไผ่ ส่วนวัสดุคลุมผิวมี สูตรที่ A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน และสูตรที่ B ที่มีมูลไส้เดือน ภายใต้สภาวะควบคุมด้วยอุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-85 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของเห็ดหิมาลัย รวมทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเห็ดหิมาลัย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้รับความรู้เกี่ยวกับวิธีการเพาะเห็ดหิมาลัยให้ได้ประสิทธิภาพ ได้ดอกเห็ดที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์

2) ทราบปริมาณโปรตีนรวมของเห็ดหิมาลัย

3) ทราบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รูปที่ 2.1 เห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*)

2.1 เห็ดหิมาลัย

ตั้งแต่สมัยโบราณเห็ดได้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศทางทิศตะวันออกและได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารสุขภาพ (Iwalokun *et al.*, 2007) เป็นที่รู้จักเพิ่มขึ้นเนื่องด้วยเห็ดอุดมไปด้วยโปรตีนและเส้นใย แม้ว่าจะมีจำนวนแคลอรี่และไขมันต่ำ (Khan *et al.*, 2011) เห็ดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่มีสรรพคุณซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพและประกอบด้วยคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการรายงานไว้แล้ว (Çaglarirmak, 2007) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านมะเร็ง แบคทีเรีย ไวรัส (Yang *et al.*, 2002)

เห็ดหิมาลัย หรือ "Milky mushroom" (*Calocybe indica*) เป็นเห็ดที่ค่อนข้างใหม่ในโลกของอุตสาหกรรมเห็ด เห็ดนี้ได้รับการรายงานครั้งแรกจากรัฐเบงกอลตะวันตกประเทศอินเดีย (Purakayastha, 1974 ; Purkayastha, 1984-85) แม้ว่าจะมีความพยายามในการทำให้เห็ดเจริญเติบโต (Purkayastha and Nayak, 1981) ความสำเร็จที่จำกัดเพียงอย่างเดียวคือการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและความสามารถในการผลิต โดย Subbiah and Balan, (2015) ได้รายงานว่าสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงของ *Calocybe indica* APK.2 และสามารถเจริญเติบโตได้ในวัสดุที่ไม่มีการหมัก สามารถเก็บเห็ดได้ตั้งแต่ 30-34 วัน หลังจากเส้นใยเจริญเต็มที่ ข้อดีของเห็ดชนิดนี้ที่มากกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ คือ วิธีการเพาะปลูกง่าย ลงทุนต่ำ มีลักษณะดอกเห็ดที่น่าสนใจ มีสีขาวนม อายุการเก็บรักษานาน คุณค่าทางโภชนาการ และใช้เวลาในการเจริญน้อย โดยทั่วไปอุดมไปด้วยโภชนาการที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว (Bokaria *et al.*, 2014).

เห็ดหิมาลัย (*C. indica*) เป็นสายพันธุ์ใหม่สำหรับโลกของเกษตรผู้เพาะเห็ด มีเนื้อสีขาวนวลเหมือนร่ม ซึ่งคล้ายกับเห็ดกระดุม (button mushroom) สายพันธุ์นี้เหมาะสมหรับสภาพอากาศที่ร้อนชื้นและสามารถปลูกในที่ที่มีอุณภูมิสูงและความชื้นสูงได้ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียสและมีความชื้นสัมพันธ์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเห็ดชนิดนี้อุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน ใยอาหาร แร่ธาตุ คาร์โบไฮเดรตและมีกรดอมิโนจำเป็นมากมาย รวมทั้งเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบี ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิค ไพริดอกซินและกรดแอสคอบิค คุณค่าทางโภชนาการของ *C. indica* เทียบได้กับเห็ดที่กินได้ชนิดอื่นๆ (Zahid *et al.*,2010).

2.1.1 โครงสร้างและลักษณะทั่วไปของเห็ดหิมาลัย

ลักษณะภายนอกของดอกเห็ดหิมาลัยคือ มีสีขาวเป็นสีเดียวกันทั้งดอกเห็ด ไม่มีน้ำยาง รูปร่างของหมวดเห็ดเป็นแบบแบนราบ ขอบหมวกเห็ดเมื่อผ่าครึ่งเป็นแบบโค้ง รูปร่างของหมวกเห็ดเมื่อมองจากด้านบนมีลักษณะเรียบ ผิวของหมวกเห็ดเรียบไม่มีแผ่นสะเก็ด ลักษณะการติดของครีบกับก้านเป็นแบบติดแนบไปกับก้าน ลักษณะของขอบครีบเป็นแบบเรียบ ระยะห่างระหว่างครีบและรูปแบบครีบเป็นแบบเรียงชิดกัน ลักษณะของผิวก้านเป็นเส้นตามยาว ลักษณะเนื้อในของก้านเป็นแบบตัน ไม่มีวงแหวน ลักษณะนิสัยการเจริญของดอกเห็ดขึ้นเป็นกระจุก (ชาญยุทธ์ และคณะ, 2546)

2.1.2 การจัดจำแนกของเห็ด

Superkingdom : Eukaryonta

Kingdom : Myceteae

Division : Amastidomyceta

Subdivision : Basidiomycetina

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Series : Hymemomycetes

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus : Calocybe

Species : indica

เห็ดหิมาลัยเป็นสิ่งมีชีวิตจัดอยู่ใน Superkingdom Eukaryonta ซึ่งใน Superkingdom Eukaryonta นั้นจัดเป็นจุลินทรีย์ที่ในเซลล์มีนิวเคลียสชนิดที่มีผนังหุ้มและภายในมี ดีเอ็นเอ, ไมโทคอนเดรีย, ไรโบโซม, เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมและกอลจิคอมเพล็กซ์ ตลอดจนมีการรวมตัวกันของยีนเกิดโดยวิธีแคริโอแกมมี่และไมโอซิส

Kingdom Myceteae ได้แก่ พวกเห็ดรา ไม่สร้างคลอโรฟิลล์ ส่วนใหญ่ผนังเซลล์ประกอบด้วยไคทินหรือเซลลูโลส

Division Amastidomyceta เป็นราที่ไม่มีเซลล์สืบพันธุ์ชนิดเคลื่อนที่ได้ มีตั้งแต่เป็นเซลล์เดี่ยวจนถึงเป็นเส้นใยยาว

Subdivision Basidiomycetina เป็นราที่มีการผสมพันธุ์ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของนิวคลีอิกต่างชนิดกันแล้วแบ่งตัวแบบไมโอซิส

Class Basidiomycetes ลักษณะที่สำคัญคือ ราจะสร้างสปอร์ที่อาศัยเพศ เรียกว่า เบซิดิโอสปอร์ ซึ่งจะเกิดอยู่ภายนอกอวัยวะที่เรียกว่า เบซิเดียม มีรูปร่างคล้ายกระบอง ปกติแต่ละเบซิเดียมจะมีเบซิดิโอสปอร์อยู่ 4 อัน

เส้นใยเจริญงอกงามดี แตกกิ่งก้านสาขามากบางครั้งเส้นใยของราจะเจริญรวมกันเป็นเส้นขนาดใหญ่มองเห็นด้วยตาเปล่าเรียกว่า rhizomorphs ซึ่งจะพบเห็นได้ง่ายบนไม้ที่กำลังผุหรือบนอินทรีย์วัตถุต่างๆเส้นใยมีผนังกั้น ราในคลาสนี้ส่วนใหญ่จะมีผนังกั้นเป็นแบบที่เรียกว่า โดลิพอร์เซปตัม ซึ่งจะแตกต่างจากราในคลาสอื่นๆ ผนังกั้นแบบนี้ตรงส่วนที่อยู่ใกล้รูของผนังจะพองออก ส่วนที่พองออกจะมีฝาครอบทั้งสองด้านซึ่งมีรูพรุน ฝาครอบแบบนี้เรียกว่า septal pore cap ราในคลาสนี้พบว่าหลายชนิดมักจะสร้าง clamp connection บนเส้นใยชนิด dikaryotic mycelium (เป็นเส้นใยที่แต่ละเซลล์จะมี 2 nuclei) การเกิด clamp connection จะเริ่มเกิดที่เซลล์ส่วนปลายของเส้นใยโดยที่เซลล์ส่วนปลายจะมีผนังด้านข้างเจริญยืดยาวออกแล้วโค้งเข้าหาผนังของเซลล์ข้างเคียงจนในที่สุดสัมผัสกับผนังของเซลล์ข้างเคียง เซลล์ที่ยืดยาวออกมานี้เรียกว่า clamp เมื่อผนังส่วนที่สัมผัสกันละลายออกนิวคลิอิกทั้งคู่จะเริ่มแบ่งตัวโดยแต่ละนิวเคลียสจะแบ่งเป็น 2 นิวคลิอิก นิวเคลียสเดิมอันที่อยู่ใน clamp หลังจากแบ่งตัวแล้วอันหนึ่งยังคงอยู่ใน clamp เหมือนเดิมสวนอีกอันที่แบ่งจะเคลื่อนไปอยู่ในเซลล์ปลาย นิวเคลียสเดิมอีกอันจะแบ่งตัวเป็น 2 นิวคลิอิก จากนั้นนิวเคลียสใน clamp จะเคลื่อนตัวผ่านผนังที่ละลายเข้าไปอยู่ในเซลล์แม่แล้วราจะสร้างผนังกั้น 2 อันแบ่งเป็น 2 เซลล์ปลายเส้นใยอันใหม่สามารถสร้าง clamp connection ได้อีกการเกิด clamp connection ถือได้ว่าเป็นการรักษาสภาพความเป็น dikaryotic mycelium ของเห็ดราไว้

เบซิเดียม จัดเป็นอวัยวะของรา Basidiomycetes ซึ่งเป็นที่เกิดแคริโอแกมมี่ (การรวมตัวผสมกันของนิวคลิอิกเป็นดิพลอยด์) และไมโอซิส (เป็นการแบ่งตัวของดิพลอยด์นิวเคลียส) เป็นผลให้ได้สปอร์ 4 อัน ซึ่งสปอร์ของราในคลาสนี้มีชื่อเฉพาะเรียกว่า เบซิดิโอสปอร์ เกิดอยู่ภายนอกเบซิเดียมโดยมีก้านยึดไว้ก้านที่ยึดเบซิดิโอสปอร์ เรียกว่า สเตอริกมา การสร้างเบซิดิโอสปอร์บนเบซิเดียมนี้ถือเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกราใน Class Basidiomycetes ออกจากคลาสอื่นๆ

Subclass Holobasidiomycetidae มีเบซิเดียม มีเซลล์เดียวไม่มีผนังกัน เห็ดหิมาลัยอยู่ใน series Hymenomycetes สำหรับ Series Hymenomycetes ราในกลุ่มนี้จะสร้างเบซิเดียและเบซิดิโอสปอร์ เรียงกันเป็นชั้นซึ่งเรียกว่า hymenium และ hymenium จะเปิดออกขณะที่เบซิดิโอ-สปอร์ยังอ่อนอยู่ เห็ดหิมาลัยอยู่ในอันดับใหญ่ คือ Agaricales

Series Hymenomycetes เห็ดทั้งหลายที่พบทั่วไปจะอยู่ในกลุ่มนี้ซึ่งรวมถึงเห็ดที่สร้างเบซิดิโอสปอร์ทั้งบนผนังของครีบและผนังของหลอด

Order Agaricales เห็ดจะมีครีบเป็นที่เกิดเบซิดิโอสปอร์จะเกิดบนผนังทั้ง 2 ข้างของครีบ

Family Tricholomataceae ครีบติดกับก้าน ครีบไม่เป็นไข ส่วนใหญ่สปอร์มีสีขาว มีหมวกและก้าน (ศุภชัย, 2540)

2.1.3 คุณค่าทางอาหารของเห็ด

เห็ดมีมานานแล้วใช้เป็นอาหารเพราะกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์และบางเบา จากหลักฐานการทดลองแสดงให้เห็นว่าเห็ดมีส่วนประกอบทางชีวภาพหลากหลายชนิดที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายและป้องกันโรคจากความเสื่อมสภาพ (Barros *et al.*2008)

เห็ดหิมาลัยมีปริมาณโปรตีน สูงกว่าเห็ดกระดุมทั่วไปแต่ต่ำกว่าเห็ดนางรม มีวิตามินและแร่ธาตุและวิตามินบีรวมที่สูง โดยทั่วไปเห็ดสดจะมีปริมาณ antioxidant สูงกว่าเห็ดแห้ง

วิธีการวิเคราะห์โปรตีน

อาศัยหลักการ โปรตีนจากตัวอย่างพืช สัตว์ และดิน ซึ่งอยู่ในรูป NH-R จะถูกย่อยเมื่อเติม sulfuric acid conc. NH-R จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ $(NH_4)_2SO_4$ โดยมี selenium mixture เป็นตัว catalyst และเมื่อเติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ $NH_4OH + Na_2SO_4$ จากนั้นทำการเปลี่ยน NH_3 จะระเหยออกมาและจะถูกจับด้วย H_3BO_3 สุดท้ายนำสารที่กลั่นได้ไปไทเทรตกับ 0.1N sulfuric acid แล้วคำนวณผลออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนและนำเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ได้ไปคูณกับเปอร์เซ็นต์ค่าแฟคเตอร์ 6.25 จะได้เปอร์เซ็นต์โปรตีนของสารตัวนั้นๆ (ปราณี, 2549)

2.2 วัสดุปลูก

วัสดุที่ใช้เพาะเห็ดหิมาลัยต้องเป็นวัสดุที่ย่อยได้ง่ายปราศจากจุลินทรีย์อื่นนอกจากเชื้อเห็ดหิมาลัย ไม่มีสารที่เป็นพิษต่อเส้นใยเห็ด เช่น สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแมลง วัสดุที่ใช้เพาะเห็ดเรียกว่า สับสเตรท สามารถใช้อาหารจากวัสดุที่นำมาใช้เพาะได้หลายชนิด เช่น ฟางข้าว หยวกกล้วย ใบไผ่ ต้นถั่วลิสง เศษหญ้าแห้ง ก้อนวัสดุที่ผ่านการเพาะเห็ดนางรม นางฟ้า เห็ดเป๋าฮื้อ ขี้เลื้อยจากไม้ยางพารา (พรศิลป์ และคมสัน, 2548)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำ ฟางข้าว ใบไผ่ หยวกกล้วย เป็นวัสดุปลูก ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นสารอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของพืช

ฟางข้าว คือ ลำต้นแห้งต้นข้าว เมื่อทำการตีเมล็ดข้าวออก หรือนวดข้าวแล้ว โดยทั่วไปลำต้นของข้าวมีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้องๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน ซึ่งฟางข้าวเป็นผลพลอยได้อย่างหนึ่ง ที่ได้หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าว แต่ถูกจัดเป็นวัสดุเกษตรเหลือทิ้ง (ธิดารัตน์ และสัญญา, 2554)

ใบไผ่ คือ ไผ่พันธุ์ตง เศษวัสดุอินทรีย์ที่หาได้ง่าย นำมาใช้เป็นวัสดุปลูกขณะที่ใบแห้ง

หยวกกล้วย คือ กล้วยน้ำหว้า เป็นพืชที่มีอยู่หลากหลายในภูมิภาคต่างๆในประเทศแถบร้อนชื้น ถูกใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเห็ด เป็นวัสดุที่ย่อยสลายได้ง่าย โดยมีความชื้นและความร้อนเป็นตัวเร่งการย่อยสลายทางธรรมชาติถูกนำมากับสายพันธุ์เห็ดที่เจริญได้ดีในสภาวะอากาศร้อน

2.3 วัสดุคลุมผิว

วัสดุคลุมผิวนับเป็นปัจจัยส่วนหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดของดอกเห็ด ดังนั้นผู้เพาะต้องปรับสภาพวัสดุคลุมผิวให้มีความชื้นในวัสดุคลุมผิวในปริมาณที่เหมาะสม โดยการให้น้ำปรับความชื้น และทำการทดสอบด้วย การนำวัสดุคลุมผิวมากำแล้วใช้มือบีบ ถ้าพบว่าในขณะที่บีบมีน้ำไหลออกมาตามง่ามมือ แสดงว่าชื้นเกินไป แต่ถ้าในขณะที่บีบน้ำไม่ไหลตามง่ามมือ และเมื่อแบมือออก วัสดุที่ใช้คลุมผิวแตกเป็นชิ้นเล็กๆ แสดงว่าแห้งเกินไป ความชื้นที่เหมาะสม คือ ในขณะที่บีบน้ำไม่ไหลออกตามง่ามมือ และเมื่อแบมือออกวัสดุที่ใช้คลุมผิวยังจับตัวเป็นก้อน ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ ขุยมะพร้าว แกลบดำ ยิปซั่ม และมูลไส้เดือน โดย pH รวมเมื่อทำการผสมแล้วควรมีค่าเป็นกลาง ขุยมะพร้าวมีค่าความเป็นกรดมากกว่าแกลบดำ ส่วนยิปซั่มและมูลไส้เดือนใส่ลงไปเพื่อเพิ่มธาตุอาหาร

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเห็ด

แบ่งได้ 2 ส่วนคือ

2.4.1 สภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเห็ด

การเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัยนอกจากอาหารแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมต่างๆ ก็เป็นสิ่งสำคัญ ประกอบด้วย

2.4.1.1 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของเห็ดหิมาลัยในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดในวัสดุปลูก และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอก นั้นจะแตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย ในอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ 30-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ดในวัสดุปลูก 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอก 30-38 องศาเซลเซียส

2.4.1.2 ความชื้น เห็ดต้องการน้ำในการเจริญเติบโตไม่สามารถขึ้นได้ในที่ขาดน้ำหรือมีความชื้นต่ำในการเพาะเห็ดนั้นความชื้นของวัสดุปลูกและความชื้นของอากาศจึงเป็นสิ่งสำคัญ การเพิ่มความชื้นในวัสดุปลูกสามารถทำได้โดยการรดน้ำ แต่อย่างไรก็ตามอย่าให้มากจนเกินไป เพราะอาจทำให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตช้าลง เนื่องจากขาดออกซิเจน ส่วนความชื้นในอากาศทำได้โดยพ่นละอองน้ำในอากาศ ดอกเห็ดจะบอบบางและมีน้ำเป็นส่วนประกอบมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หากความชื้นในอากาศน้อยก็จะเกิดการระเหยของน้ำออกไปจากดอกเห็ด ทำให้ดอกเห็ดแห้งและชะงักการเจริญเติบโต ความชื้นสัมพัทธ์ของเห็ดหิมาลัยอยู่ที่ 80-85 เปอร์เซ็นต์ (ปัญญา และกิตติพงษ์, 2538)

2.4.1.3 แสง เห็ดหลายชนิดไม่ต้องการแสงในการเจริญเติบโตของเส้นใยและดอกเห็ด แต่แสงอาจมีผลต่อการออกดอก ซึ่งในดอกเห็ดหิมาลัยแสงจะมีผลต่อความยาวก้านดอกเห็ด ถ้าแสงมากก้านดอกจะสั้นกว่าเมื่อมีแสงน้อย

2.4.1.4 ความเป็นกรดเป็นด่าง เห็ดชอบความเป็นกลาง คือ pH 7 ในอาหารที่เป็นกรดหรือเป็นด่างมากเกินไป เห็ดอาจเจริญเติบโตได้เฉพาะเส้นใยเท่านั้นแต่เห็ดไม่สามารถสร้างดอกได้

2.4.1.5 อากาศ เห็ดต้องการออกซิเจนทั้งตอนเป็นดอกและระยะเส้นใย แต่ในระยะเส้นใยจะทนทานต่อการขาดออกซิเจนได้ดีกว่าระยะดอก โรงเรือนเพาะเห็ดควรมีการระบายของอากาศที่ดี ไม่สะสมคาร์บอนไดออกไซด์มากจนเป็นอันตรายกับเห็ด (ชาญยุทธ์ และคณะ, 2546)

2.4.2 ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตเห็ด

2.4.2.1 ประสบการณ์ในการเพาะเห็ด เนื่องจากเห็ดหิมาลัยเป็นเห็ดที่ยังไม่ได้รับความนิยมในประเทศไทยมากนักทำให้ผู้เพาะเห็ดยังขาดความรู้ เทคโนโลยี และข้อมูลข่าวสารที่ถูกต้อง และยังไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของดอกเห็ด

2.4.2.2 เชื้อเห็ด เชื้อเห็ดไม่สามารถบอกได้ว่ามีมาตรฐานหรือมีคุณภาพดียังขาดมาตรการในการควบคุมดูแลให้เชื้อเห็ดมีมาตรฐานการผลิตอย่างถูกต้องเหมาะสม

2.4.2.3 วัสดุปลูก สิ่งที่ต้องพิจารณาเนื่องจากในปัจจุบันวัสดุที่ใช้เพาะมีราคาสูงส่งผลต่อการลงทุนการผลิต จึงจำเป็นต้องใช้วัสดุปลูกในท้องถิ่น หรือหาวัสดุที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ เพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.4.2.4 ศัตรูเห็ด ในโรงเรือนต้องคำนึงถึงความสะอาด เพื่อยับยั้งการเกิดโรคและศัตรูเห็ด เช่น แมลง ไร โรคจากแบคทีเรีย ไวรัส (ปัญญา และกิตติพงษ์, 2538)

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัวโคจรอยู่รอบวงนอกสุด เกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกและมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวเหลืออยู่บนอนุมูล ซึ่งการมีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและมีความไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูง โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร ซึ่งโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่และเข้าทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1999)

การออกซิเดชั่นเป็นกระบวนการที่สำคัญในการผลิตพลังงานในระบบชีวภาพ อย่างไรก็ตามมีปฏิกิริยาออกซิเจนหลายชนิด และอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้อง หรือเกิดขึ้นเป็นผลมาจากกระบวนการออกซิเดชั่น ปฏิกิริยาเหล่านี้มักก่อให้เกิดการตายของเซลล์ และมีส่วนร่วมในกระบวนการเสื่อมสภาพอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีอนุภาคของออกซิเจนเชิงปฏิกิริยา และอนุมูลอิสระพบว่ามีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบ โรคตับแข็ง เป็นต้น เซลล์ประกอบด้วย

เอนไซม์ เช่น superoxide dismutase, catalase และสารเคมี เช่น วิตามินอี วิตามินซี โพลิฟีนอล แคโรทีนอยด์ และกลูตาไทโอน (Niki *et al.* 1994)

อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$), Superoxide anion radical ($O_2^{-\cdot}$) เป็นต้น โดยอนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก ซึ่งกลไกการเกิดอนุมูลอิสระมีดังต่อไปนี้ (โอภา และคณะ, 2549)

ก. การแตกของพันธะโควาเลนท์แบบไอโมไลซิส (Imolysis)

$$A : B \longrightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$$

ข. การเพิ่มอิเล็กตรอน 1 ตัว ให้แก่อะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A + e \longrightarrow A^{-\cdot}$$

ค. การสูญเสียอิเล็กตรอน 1 ตัว จากอะตอมที่เป็นกลางทางไฟฟ้า

$$A \longrightarrow A^{+\cdot} + e$$

2.5.1 กลุ่มของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1.กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (reactive oxygen species, ROS)

2.กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (reactive nitrogen species, RNS)

3.กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (reactive chlorine species, RCS)

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องแสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (โอภา และคณะ, 2549)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion ($O_2^{-\cdot}$)	H_2O_2, Ozone (O_3)
Hydroxyl ($HO^{\cdot}$)	Hypobromous acid (HOBr)
Hydroperoxyl ($HO_2^{\cdot}$)	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxyl ($RO_2^{\cdot}$)	Singlet oxygen ($O_2\,^1\Delta g$)
Alkoxyl ($RO^{\cdot}$)	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ($CO_3^{-\cdot}$)	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
Carbon dioxide ($CO_2^{-\cdot}$)	Peroxynitrous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide ($NO^{\cdot}$)	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide ($NO_2^{\cdot}$), ($NO_2^{-\cdot}$)	Nitrosyl cation (NO^+), Nitroxyl anion(NO^-)
	Dinitrogen tetroxide (N_2O_4)
	Dinitrogen trioxide (N_2O_3)
	Peroxynitrite ($ONOO^-$)

	Peroxynitrous acid (ONOOH)
Reactive chlorine species (RCS) Atomic chlorine (Cl)	 Hypochlorous acid (HOCl) Chloramines Chlorine gas (Cl_2)
Other Thioyl radical ($RS^{\cdot}$)	

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนตีออกซิแดนท์เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริค บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล

ในทางเคมีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น กระบวนการออกซิเดชั่นมีได้หลายรูปแบบ กระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกาย ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชั่น อนุมูลอิสระต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว (โอภา และคณะ, 2549)

2.5.2 ผลกระทบของการเกิดอนุมูลอิสระ

2.5.2.1 ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (ปราณีรัตน์, 2551)

ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล คือ ภาวะของความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระ และกระบวนการป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระในเซลล์หรือร่างกายโดยเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระทำให้มีอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลิตผลของอนุมูลอิสระอันมีความไวและอันตรายสูงในปริมาณที่สูงมากเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ ทำให้เซลล์ เนื้อเยื่อเมมเบรนถูกคุกคามจากการถูกออกซิไดซ์ และเมื่อถูกออกซิไดซ์เซลล์จะบาดเจ็บและถูกทำลาย สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลมี 2 สาเหตุ คือ

1. ความบกพร่องของกระบวนการป้องกันอันตรายจากการเกิดออกซิเดชัน โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระลดลง เอนไซม์ที่ทำหน้าต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมีปริมาณลดลง หรือการทำงานผิดไปจากปกติ ซึ่งสาเหตุของการเกิดความบกพร่อง ได้แก่ การกลายพันธุ์ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถของเอนไซม์ในการทำหน้าที่ต้านออกซิเดชั่น เช่น Superoxide dismutases, Glutathione peroxidase ทำงานบกพร่องหรือสูญเสียการทำงาน หรือสูญเสียสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในกระบวนการป้องกันอนุมูลอิสระ เช่น กลูตาไทโอน วิตามินซี วิตามินอี ลดลงหรือหมดปด้วยสาเหตุ

ต่างๆ รวมถึงการขาดสารอาหารและแร่ธาตุ เช่น Zn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Se^{2+} และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น สารประกอบโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เป็นต้น

2. การเกิดหรือผลิตอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลิตผลของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เช่น การที่ร่างกายได้รับออกซิเจนมากเกินไป หรือมีการกระตุ้นระบบที่สร้างอนุมูลอิสระ เช่น ในภาวะที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง (เซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มฟาโกไซต์จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดอนุมูลอิสระและผลิตผลที่เกี่ยวข้องจำนวนมากมีผลทำให้เกิดความเสียหายและการถูกทำลาย)

2.5.2.2 อันตรายจากภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลสามารถแบ่งเป็นระดับตามความรุนแรงจากน้อยไปหามากได้ดังนี้

ก.การปรับตัวของเซลล์ ซึ่งมีได้หลายกรณี ตั้งแต่สามารถป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายได้สมบูรณ์ หรือป้องกันได้ในระดับหนึ่งแต่ไม่สมบูรณ์ หรืออาจมีการป้องกันมากเกินไปจนส่งผลให้เซลล์มีการปรับตัวทนต่อภาวะออกซิเดชั่นสูงๆได้

ข.การบาดเจ็บของเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งมีชีวโมเลกุลเป้าหมายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง ทำให้ได้รับผลกระทบสูง ได้แก่ ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ

ค.การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ในสภาวะการเกิดออกซิเดชั่นหากเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมและมีชีวิตอยู่ได้ เซลล์จะตายในที่สุด โดยมีกลไกการตายทั้งในแบบ apoptosis และ necrosis

2.5.2.3 ภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุลโดยอนุมูลอิสระต่อการเกิดโรค

การที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้หรือกำจัดได้ไม่เพียงพอเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคต่างๆมากมาย เช่น ภาวะผนังเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลง เนื่องจากการสะสมไขมันที่ผนังหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดตีบตันเกิดภาวะขาดเลือดชั่วขณะที่สมองและหัวใจ, โรคมะเร็ง, โรคอัลไซเมอร์,โรคพาร์กินสัน,ภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน,ภาวะการติดเชื้อที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และกระบวนการชราภาพ เป็นต้น

2.5.3 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการพัฒนาค้นคว้ากันอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากแนวคิดเรื่องการกลับคืนสู่ธรรมชาติ ประกอบกับความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค สารต้านอนุมูลิอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการมีโครงสร้างเป็นสารประกอบ ฟีนอลิค โดยเฉพาะโพลีฟีนอล เช่น แซนโธน และฟลาโวนอยด์ ซึ่งประกอบด้วยหมู่ aromatic hydroxyl ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่นเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่างๆไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ โดยการให้อนุมูล H* แก่อนุมูลิอิสระเหล่านั้น (Van Acker *et al.*,2000) นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ *ortho*-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH* ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชั่น คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำโดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนได้อีกด้วย (Atrooz, 2009)

2.5.4 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลิอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติ และสมุนไพรมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมี และมีฤทธิ์ดีขึ้น กลุ่มของสารประกอบฟีนอลิคสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และtertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลิอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

แอสคอบิค เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการรักษาซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การรักษาบาดแผล การสร้างกระดูก การล้างสารพิษในร่างกาย การดูดซึมธาตุเหล็ก การสังเคราะห์คอลลาเจน การป้องกันการแข็งตัวของหลอดเลือด และในกระบวนการเผาผลาญอื่นๆ อีกมากมาย (Tomita *et al.*, 2005) (Voet and Voet, 1995) (Mello and Kubota, 2007)

วิตามินซี สามารถออกซิไดซ์ได้ง่ายการย่อยสลายจะถูกเร่งด้วยความร้อน แสง และโลหะหนัก (Bhagavan, 2002) (Mohora, 2006) (Wawrzyniak *et al.*,2005) วิตามินซีเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพที่สำคัญของอาหาร (Wawrzyniak *et al.*,2005) และก่อให้เกิดคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของอาหาร (Glevitzky *et al.*, 2008) (Popa *et al.*, 2010) (Pisoschi *et al.*, 2008 ; Pisoschi *et al.*, 2010 ; Pisoschi *et al.*,2011)

วิธีการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 2.2 วิธีการวิเคราะห์ต่างๆ (Giardi MT *et al.*, 2010) ในการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระถูกจัดอยู่ในหมวดหมู่ที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ	หลักการของวิธีการ	ผลของผลิตภัณฑ์สุดท้าย
เทคนิคการวิเคราะห์		
DPPH	ปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระอินทรีย์	การวัดความเข้มสี
ABTS	ปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยอนุมูลอิสระอินทรีย์ประจุบวก	การวัดความเข้มสี
FRAP	ปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระด้วย Fe(III) complex	การวัดความเข้มสี
PFRAP	ปฏิกิริยารีดักชั่น Potassium ferricyanide โดยสารต้านอนุมูลอิสระและปฏิกิริยาที่ตามมาของ Potassium	การวัดความเข้มสี

	ferricyanide ด้วย Fe3+	
CUPRAC	ปฏิกิริยารีดักชั่นจาก Cu (II) ไปเป็น Cu (I) โดยสารต้านอนุมูลอิสระ	การวัดความเข้มสี
ORAC	ปฏิกิริยาต่อต้านอนุมูลอิสระด้วย อนุมูลอิสระเพอร์ออกซิลที่เกิดจาก (2,2'-azobis-2-amidino-propane)	การสูญเสียการเรืองแสงของ fluorescein
HORAC	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในการดักจับอนุมูล OH ที่เกิดจากระบบ Fenton แบบ Co(II)	การสูญเสียการเรืองแสงของ fluorescein
TRAP	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อขจัดอนุมูลอิสระลูมินอลที่เกิดจากการสลายตัวของ APPH	การเปล่งแสงทางเคมีดับลง
Fluorimetry	การปลดปล่อยแสงโดยใช้สารที่ดูดซับแสงหรือรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าอื่นๆที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน	การบันทึกการกระตุ้นการเรืองแสง/สเปกตัมการรังสี

วิธี DPPH

เป็นวิธีวัดความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชั่นอนุมูล DPPH* เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำได้โดยใช้เครื่องมือ EPR หรือ ใช้เครื่องสเปคโตรวัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การวางแผนการทดลอง

วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) และ One-Way ANOVA โดยวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ ดังนี้

- จำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง
- จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด
- จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก
- จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้
- ความยาวของก้านดอก
- เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด
- น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด
- ค่าประสิทธิภาพการผลิต
- การวัดและประเมินผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม
- การวัดและประเมินผลความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Tukey's Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยรวบรวมผลด้วยโปรแกรม Minitab version 18.1

ตัวแปรอิสระ/ปัจจัย

1. วัสดุปลูก มี 6 ชนิด
2. วัสดุคลุมผิว มี 2 ชนิด

ตัวแปรตาม คือ ค่าเฉลี่ยผลจากการทดลอง

- จำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง
- จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด
- จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก
- จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้
- เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด
- ความยาวของก้านดอก
- น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด
- ค่าประสิทธิภาพการผลิต
- การวัดและประเมินผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม
- การวัดและประเมินผลความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงชนิดของจำนวนหน่วยทดลอง

ชนิด	สูตร A ไม่มีมูลไส้เดือน	สูตร B มีมูลไส้เดือน
ฟางข้าว	แปลงที่ 1	แปลงที่ 2
ฟางข้าว ผสม หยวกกล้วย	แปลงที่ 3	แปลงที่ 4
หยวกกล้วย	แปลงที่ 5	แปลงที่ 6
ฟางข้าว ผสม ใบไผ่	แปลงที่ 7	แปลงที่ 8
ใบไผ่	แปลงที่ 9	แปลงที่ 10
หยวกกล้วย ผสม ใบไผ่	แปลงที่ 11	แปลงที่ 12

หมายเหตุ แต่ละแปลงมีจำนวนหน่วยทดลองแปลงละ 3 หน่วย

3.1. ขั้นตอนการแยกเชื้อเห็ดหิมาลัยบริสุทธิ์ ดัดแปลงมาจาก Ragupathi *et al.*,2016 และ อนงค์. 2535

3.1.1 แยกสปอร์จากดอกเห็ดหิมาลัย

เก็บดอกเห็ดจากแปลงสาธิตที่มีลักษณะขอบของหมวกเห็ดที่คลี่ออก จากนั้นนำส่วนหมวกเห็ดที่ตัดส่วนลำต้นออกนำมาวางบนจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รอเวลาให้สปอร์ของดอกเห็ดตกลงมาบนจานเพาะเชื้อ นำลูปเผ่าฆ่าเชื้อจุ่มลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เขี่ยสปอร์ลงบนจานอาหารเพาะเชื้อ PDA และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 วัน จะได้เส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA

3.1.2 แยกก้านจากดอกเห็ดหิมาลัย

วิธีนี้เหมาะสำหรับเห็ดที่มีก้านใหญ่และเห็ดที่ไม่มีเปลือกหุ้มดอกอ่อน ซึ่งเห็ดหิมาลัยเป็นเห็ดขนาดใหญ่ ก้านดอกแข็ง ภายในก้านดอกอาจจะมีแมลงเข้าไปเจาะไชแต่เป็นไปได้น้อย วิธีการนี้ก็ได้ผลดีและนิยมทำกันมาก เมื่อคัดเลือกดอกเห็ดตามลักษณะที่ต้องการแล้ว ใช้มือที่สะอาดฉีกเห็ดเป็น 2 ซีก ใช้เข็มเขี่ยเชื้อฆ่าเชื้อแล้วกรีดเนื้อเห็ดตรงกลางก้านออกเป็นชิ้นเล็กๆแล้วตักขึ้นถ่ายใส่จานอาหาร PDA และหลอดอาหาร PDA ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 วัน จะได้เส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA

3.2. การเพิ่มจำนวนเส้นใยเห็ดหิมาลัย โดยเลือกใช้ข้าวฟ่างซึ่งเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยตามรายงานของ Lakshmipathy *et al.*, 2012

3.2.1 วิธีการผลิตเชื้อข้าวฟ่าง ดัดแปลงจาก ถาวร และคณะ 2547

<u>การเลือกเมล็ดข้าวฟ่าง</u> ให้เลือกเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ เมล็ดไม่แตกหักมากนักและเป็นเมล็ดพันธุ์ใหม่ที่จำหน่ายให้พวกเลี้ยงสัตว์เท่านั้น เนื่องจากไม่มีสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเชื้อราตกค้าง ส่วนพันธุ์ข้าวฟ่างจะใช้ข้าวฟ่างแดง แต่ข้าวฟ่างขาวจะใช้เป็นอาหารสัตว์

การล้างเมล็ดข้าวฟ่าง นำเมล็ดมาล้างเอาฝุ่นละอองออกและคัดเมล็ดที่ลอยน้ำซึ่งเป็นเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์หรือถูกแมลงทำลายออกไป เหลือแต่เมล็ดที่จมน้ำซึ่งเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์นำมาทำให้สุกต่อไป

การทำให้สุกโดยการต้ม แช่เมล็ดที่ล้างสะอาดแล้วในน้ำเพื่อให้เมล็ดอมน้ำสามารถสุกได้ง่าย เป็นเวลา 1 คืนแล้วนำมาล้างน้ำอีกหลายๆครั้งจนหมดกลิ่นเปรี้ยว นำเมล็ดข้าวฟ่างที่ล้างสะอาดดีแล้วลงต้มในหม้อหรือภาชนะขนาดใหญ่พอเหมาะกับจำนวนเมล็ด เร่งไฟให้น้ำเดือดแล้วจึงค่อยหรี่ไฟ อาจใช้ไม้พายช่วยกวนบ้างเพื่อให้เมล็ดกระจายได้รับความร้อนอย่างทั่วถึงจนเมล็ดข้าวฟ่างเริ่มสุกเล็กน้อย คือพองและปริเล็กน้อยไม่ควรต้มจนเมล็ดพองบานเพราะจะใช้ทำงานไม่สะดวกจากนั้นตักเมล็ดข้าวฟ่างขึ้นมาจากหม้อแล้วเกลี่ยบางๆผึ่งลมให้สะเด็ดน้ำต่อไป

การผึ่งเมล็ดข้าวฟ่างสุก นำเมล็ดข้าวฟ่างใส่ในกระด้งถาดหรือตะแกรงที่น้ำผ่านออกได้ ใส่เมล็ดวางแผ่ให้แห้งในบางแห่งอาจใช้พัดลมเป่า และคอยเกลี่ยเมล็ดก็จะทำให้เมล็ดแห้งเร็วยิ่งขึ้น

การกรอกใส่ขวด ใช้ขวดที่ล้างสะอาดและตากแห้งมาแล้วกรอกเมล็ดข้าวฟ่างจนได้ประมาณครึ่งขวดหรือ 2 ใน 3 ของขวด โดยไม่ควรใส่เมล็ดข้าวฟ่างสุกมากหรือน้อยเกินไป เนื่องจากหากใส่มากเกินไปเส้นใยเห็ดจะเจริญได้ช้า แต่ถ้าใส่น้อยเกินไปเส้นใยเห็ดจะเจริญเร็วเกินไป

การอุดจุก ใช้สำลีปั้นจุกให้มีขนาดพอเหมาะอุดได้ไม่แน่นไม่หลวมจนเกินไป

การป้องกันจุกเปียกขณะนึ่ง คลุมด้านบนด้วยกระดาษและรัดยางติดกับปากขวดก่อนนึ่ง ซึ่งหลังจากฆ่าเชื้อแล้วจะเก็บรอการใช้งานได้นานโดยไม่ต้องแกะกระดาษหุ้มจุกออก

การฆ่าเชื้อ ใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และรักษาระดับความดันที่ 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

การใส่เชื้อวุ้นลงข้าวฟ่าง สำรวจดูว่าเมล็ดข้าวฟ่างไม่บูด (ถ้านึ่งไม่ดีข้าวฟ่างจะบูดภายใน 2 วัน) สังเกตเห็นน้ำเยิ้มขาวๆ หรือแฉะเหนียวหนืด ซึ่งอาจเป็นการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การใส่เชื้อวุ้นลงข้าวฟ่างจะใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เปิดจานเพาะเชื้อหรือหลอดอาหาร PDA ซึ่งควรมีเชื้อเจริญเป็นเส้นใยดีเกือบเต็มผิวหน้าวุ้นหรือเพิ่งเจริญเต็มผิวใหม่ๆไม่มีเชื้ออื่นปะปน ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร จากนั้นจับปากขวดข้าวฟ่างขึ้นเปิดจุกสำลีลนไฟปากขวด ตะแคงขวดให้เมล็ดข้าวฟ่างไหลมาทางใกล้ปากขวดส่วนหนึ่ง แต่อย่าให้หกออกมาวางชิ้นวุ้นลงในส่วนลึกของขวด คะเนว่าเมื่อวางขวดตั้งแล้วเมล็ดข้าวฟ่างจะไหลกลบชิ้นวุ้นให้อยู่ท่ามกลางเมล็ดข้าวฟ่างพอดี นำเข็มเขี่ยออกลนไฟปากขวด อุดจุกสำลีและห่อจุกด้วยกระดาษ แล้วรัดด้วยหนังยางนำไปบ่มเชื้อต่อไป

การบ่มเชื้อข้าวฟ่าง นำขวดที่ใส่เชื้อวุ้นลงข้าวฟ่างไปเก็บหรือวางบนชั้นในห้องที่ไม่ถูกแดดส่องและไม่มีเศษผงละอองมากเกินไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน หมั่นตรวจสอบทุกวันหากพบขวดใดมีการปะปนของเชื้อให้นำออกไปฆ่าเชื้อเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ ซึ่งอาจมีตัวไรที่กินเส้นใยเห็ดเป็นแมลงพาหะ ในขั้นตอนนี้เส้นใยเห็ดจะเจริญแผ่ลามออกมาจากชิ้นวุ้น กระจายออกทุกทิศทุกทางจนเต็มขวด

การแก่ของเชื้อ เชื้อข้าวฟ่างที่เหมาะสมต่อการใช้งานมากที่สุดคือ เมื่อเส้นใยเริ่มเจริญเต็มขวดใหม่ๆ สามารถเขย่าให้เมล็ดร่วนได้ง่ายเหมาะต่อการเทเชื้อลงในถุงก้อนเชื้อเห็ด ซึ่งถ้าทิ้งไว้นานเกินไปจนเส้นใยแก่ เส้นใยจะสานกันแน่นเขย่าไม่ร่วน เทเชื้อไม่ได้ หากจำเป็นและต้องการยืดอายุเชื้อข้าวฟ่างที่เจริญเต็มที่แล้วออกไป อาจทำได้โดยการเขย่าให้ร่วนทุกวันแต่คุณภาพของเชื้อจะไม่ดีเท่าระยะที่เพิ่งเจริญเต็มขวดใหม่ๆ

3.2.2 การผลิตวัสดุคลุมผิวด้านบนก้อนเชื้อเห็ด สูตรที่ใช้ ดังนี้

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงสูตรที่ใช้ผลิตวัสดุคลุมผิว

สูตร A ไม่มีมูลไส้เดือน	สูตร B มีมูลไส้เดือน
ขุยมะพร้าว 50 % แกลบดำ 40 % ยิปซั่ม 10 %	ขุยมะพร้าว 35 % แกลบดำ 30 % มูลไส้เดือน 25 % ยิปซั่ม 10 %

3.3. การเพาะให้ออกดอก เติมวัสดุคลุมผิวด้านบนก้อนเชื้อเห็ด 2 สูตร จากหัวข้อ 2.2.จำนวน 150 กรัม พ่นไอน้ำ 250 มิลลิลิตรต่อถุงเพาะ 1 ถุง โดยแต่ละสูตรมีวัสดุปลูกแตกต่างกัน 6 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีวัสดุคลุมผิวชนิดละ 2 สูตร รวมทั้งสิ้น 12 แปลง

- ชนิดที่ 1 ฟางข้าว
- ชนิดที่ 2 ฟางข้าว ผสม หยวกกล้วย
- ชนิดที่ 3 หยวกกล้วย
- ชนิดที่ 4 ฟางข้าว ผสม ใบไผ่
- ชนิดที่ 5 ใบไผ่
- ชนิดที่ 6 หยวกกล้วย ผสม ใบไผ่

ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงวัสดุปลูก วัสดุคลุมผิวสูตร A ไม่มีมูลไส้เดือน และสูตร B มีมูลไส้เดือน

ชนิด	สูตร A ไม่มีมูลไส้เดือน	สูตร B มีมูลไส้เดือน
ฟางข้าว	แปลงที่ 1	แปลงที่ 2
ฟางข้าว ผสม หยวกกล้วย	แปลงที่ 3	แปลงที่ 4
หยวกกล้วย	แปลงที่ 5	แปลงที่ 6
ฟางข้าว ผสม ใบไผ่	แปลงที่ 7	แปลงที่ 8
ใบไผ่	แปลงที่ 9	แปลงที่ 10
หยวกกล้วย ผสม ใบไผ่	แปลงที่ 11	แปลงที่ 12

หมายเหตุ แต่ละแปลงมีจำนวนหน่วยทดลองแปลงละ 3 หน่วย

ขั้นตอนการเตรียมวัสดุปลูก

1. หั่นหยวกกล้วยจนได้ขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร เตรียมใบไผ่ยาวประมาณ 7-10 เซนติเมตร และฟางข้าวยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร
2. นำหยวกกล้วย ใบไผ่ และฟางข้าว ตากแดดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงจนแห้ง
3. นำมาวัดหาค่าความชื้น โดย หยวกกล้วยมีความชื้นอยู่ที่ 13.09 เปอร์เซ็นต์ ใบไผ่มีความชื้นอยู่ที่ 10.33 เปอร์เซ็นต์ และฟางข้าวมีความชื้นอยู่ที่ 13.10 เปอร์เซ็นต์

ขั้นตอนการลงวัสดุปลูก

1. เตรียมถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน ขนาด 14x22 ซม.
2. นำวัสดุปลูกใส่ถุง ถุงละ 250 กรัม แปลงที่ 3,4,7,8,11,12 ใช้ส่วนผสมชนิดละ 125 กรัม
3. นำวัสดุปลูกฆ่าเชื้อด้วยความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยความชื้นภายในถุงอยู่ที่ 65-70 เปอร์เซ็นต์
4. ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน
5. โรยหัวเชื้อข้าวฟ่างบริเวณขอบถุงโดยรอบ ทำในตู้นิรภัย
6. ห้ามอากาศเข้า ไม่ต้องการแสง ต้องการความชื้นได้เล็กน้อย
7. บ่มใช้เวลาประมาณ 20-25 วัน ที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส
8. เมื่อเส้นใยเดินเต็มถุง ทำการเปิดปากถุง
9. ทำการคลุมผิวด้วยวัสดุคลุมผิว สูตร A ไม่มีมูลไส้เดือน และ B มีมูลไส้เดือน เปิดปากถุงทิ้งไว้โดยรักษาความชื้นมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10 วันจะเริ่มมีตุ่มดอกเห็ดขึ้น
10. ใช้เวลาเพาะนับตั้งแต่เริ่มทำถุงประมาณ 40-45 วัน

3.4. การเก็บเกี่ยวผลผลิต

เก็บเกี่ยวดอกเห็ดที่มีลักษณะหมวกเห็ดไม่บานออกจนหมด แต่ยังคงมีการม้วนตัวของขอบหมวกเห็ดอยู่เล็กน้อย โดยจับก้านดอกเห็ดโยกขึ้นลงเบาๆ ไม่ดึงมาตรงๆ เพราะจะทำให้เส้นใยขาดตอนได้ ทำให้ส่วนที่เหลืออยู่เน่าได้ ตัดส่วนที่ติดกับเส้นใยตรงก้อนเชื้อเห็ดออกก่อนนำไปใช้

3.5. วิเคราะห์และประเมินคุณภาพผลผลิต

3.5.1 การวัดและประเมินผลทางกายภาพดัดแปลงตาม Bokaria *et al.*, 2014 และ Amin *et al.*, 2010

3.5.1.1 จำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง

เริ่มนับจำนวนวันตั้งแต่ขั้นตอนการใส่เมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเห็ดเจริญ จนถึงวันที่เริ่มใส่วัสดุคลุมผิว

3.5.1.2 จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด

เริ่มนับจำนวนวันตั้งแต่ขั้นตอนใส่วัสดุคลุมผิวจนถึงวันที่เริ่มมีการเจริญเป็นตุ่มเห็ด

3.5.1.3 จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก

เริ่มนับจำนวนวันตั้งแต่วันที่มีการเจริญเป็นตุ่มเห็ด จนถึงวันที่สามารถเก็บเกี่ยวดอกเห็ดได้

3.5.1.4 จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้

3.5.1.5 เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด

วัดโดยใช้เส้นเชือกทาบจากขอบด้านหนึ่งของหมวกเห็ดไปยังขอบอีกด้านหนึ่งของหมวกเห็ด

3.5.1.6 ความยาวของก้านดอก

วัดโดยใช้เส้นเชือกทาบจากด้านบนสุดใต้ครีบหมวกเห็ด ไปยังปลายสุดของก้านดอก

3.5.1.7 น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด

3.5.1.8 ค่าประสิทธิภาพการผลิต

โดยประเมินค่าประสิทธิภาพการผลิตต่อ 1 หน่วยทดลอง (ถุง)

$$B.E.\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตเห็ดสดที่ได้รับ}}{\text{น้ำหนักแห้งของวัสดุปลูกรวมกับวัสดุคลุมผิว } (400 \text{ กรัม})} \times 100$$

3.5.2. การวัดและประเมินผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม โดยวิธี Kjeldahl method Jones, J.B.Jr., 1991 และดัดแปลงจาก ปราณี, 2549

สารเคมี

- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง คอปเปอร์ซัลเฟต : โพแทสเซียมซัลเฟต อัตราส่วน 1:10)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับให้ ได้ 100 มิลลิลิตร
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
- กรดบอริก เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ
- อินดิเคเตอร์ใช้ mixed indicator : เมทิลเรด 0.1 กรัม : สารโบรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัม ใน เอทานอล 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

- ชั่งตัวอย่าง 1.5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mixed catalyst : คอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม, โพแทสเซียมซัลเฟต 2 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร

<u>การย่อย (Digestion)</u>

- ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆจนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

<u>การกลั่น (Distillation)</u>

- เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10-15 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
- เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ 40-50 มิลลิลิตร

- นำ receiving flask ที่มีกรดบอริก เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ อยู่ 25 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์รองรับสารละลายที่กลั่นได้
- กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 มิลลิตร
- ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู
- ทำ blank ได้ตามขั้นตอนข้างต้นโดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง
- คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\times N\times 1.4\times F}{W_t}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

W_t คือ น้ำหนักตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือ ค่าแฟคเตอร์ เมื่อ conversion factor เท่ากับ 6.25

3.5.3. การวัดและประเมินผลความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงมาจากวิธีของ Barros *et al.*, 2008

การเตรียมตัวอย่าง

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Barros *et. al.*, 2008 นำฟรุตติ้งบอดีของเห็ดแห้งมาตัดให้เป็น ชิ้นเล็กๆแล้วนำไปปั่นให้ละเอียด นำผงเห็ดแห้งที่ได้ไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 300 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำผงเห็ดที่ได้มา 3 กรัม เติมเมทานอลลงไป 100 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดสารจากตัวอย่างเห็ดบ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองแยกกากและส่วนใสโดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ส่วนใสที่ได้จากการกรอง นำไปทำการระเหยด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดหยาบแห้งที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

วิธีการวิเคราะห์นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Barros *et. al.*, 2008 เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้น 200 150 100 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารสกัดจากเห็ดแต่ละความเข้มข้นมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย DPPH ในเมทานอลเข้มข้น 6×10^{-5} โมลต่อลิตร ปริมาตร 190 ไมโครลิตร นำสารผสมที่ได้ไปเขย่าอย่างรุนแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จดบันทึกค่าที่วัดได้ โดยใช้ Ascorbic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เป็นตัวเปรียบเทียบ ค่าที่วัดได้นำไปคำนวณหาความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระตามสมการดังต่อไปนี้

สูตรคำนวณการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (% RSA)

$$\% \text{ RSA} = [(A_{DPPH} - A_s)/A_{DPPH}] \times 100$$

โดย A_{DPPH} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบ

IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่ดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ถึง 50 % ซึ่งถูกคำนวณได้จากการพล็อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารสกัด

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลองทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดย One-Way ANOVA และ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) พร้อมวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Tukey's Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง โดยไม่มีวัสดุคลุมผิวด้วยวิธีทางสถิติ $P<0.05$

วัสดุปลูก	จำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง (วัน)
ฟางข้าว	16.33 ± 0.58^{a}
ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย	27.67 ± 0.58^{c}
หยวกกล้วย	27.67 ± 0.58^{c}
ฟางข้าวผสมใบไผ่	28.67 ± 0.58^{c}
ใบไผ่	28.67 ± 0.58^{c}
หยวกกล้วยผสมใบไผ่	20.67 ± 0.58^{b}

หมายเหตุ a, b, c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดลองปลูกเห็ดหิมาลัยด้วยวัสดุปลูก ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้ดีที่สุดที่ทำให้สปอร์ของเห็ดหิมาลัยเจริญได้เต็มถุงเร็วที่สุดนั้นแตกต่างกันระหว่างวัสดุปลูกอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% คือ ฟางข้าว เป็นเวลา 16.33 วัน ลำดับถัดมา คือ หยวกกล้วยผสมใบไผ่ เป็นเวลา 20.67 วัน และลำดับสุดท้าย มี 4 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย หยวกกล้วย ฟางข้าวผสมใบไผ่ ใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุปลูกทั้ง 4 ชนิดอย่างไม่มีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% คือ 27.67, 27.67, 28.67 และ 28.67 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ ด้วยวิธีทางสถิติที่วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวมีอิทธิพลร่วมกัน P<0.05

วัสดุปลูก/วัสดุคลุมผิว	จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด (วัน)		จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก (วัน)		จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้ (ดอก)		ความยาวของก้านดอก (เซนติเมตร)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
ฟางข้าว	15.33±1.16^{a}	15.67±0.33^{a}	7.00±0.00^{a}	6.67±0.58^{a}	3.33±0.58^{abc}	4.33±0.58^{a}	15.12±1.32^{a}	11.52±1.12^{ab}
ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย	17.00±0.00^{a}	14.33±0.58^{a}	8.00±0.00^{ab}	7.33±0.58^{ab}	2.00±0.00^{de}	3.00±0.00^{bcd}	4.93±1.77^{c}	8.39±3.08^{bc}
หยวกกล้วย	-	-	-	-	-	-	-	-
ฟางข้าวผสมใบไผ่	20.00±1.00^{b}	27.67±1.53^{b}	8.67±0.58^{b}	10.33±0.58^{c}	3.67±0.58^{ab}	2.67±0.58^{bcde}	8.65±1.28^{bc}	12.09±2.21^{ab}
ใบไผ่	20.67±2.08^{b}	14.67±0.58^{a}	7.67±0.58^{ab}	7.33±0.58^{ab}	1.67±0.58^{e}	3.00±0.00^{bcd}	9.90±1.61^{bc}	7.44±0.63^{bc}
หยวกกล้วยผสมใบไผ่	28.00±1.00^{b}	15.67±1.16^{a}	10.67±0.58^{c}	7.67±0.58^{ab}	2.33±0.58^{cde}	3.33±0.58^{abc}	9.84±2.94^{bc}	9.08±1.89^{bc}

หมายเหตุ A คือ วัสดุคลุมผิวที่ไม่ผสมมูลไส้เดือน B คือ วัสดุคลุมผิวที่ผสมมูลไส้เดือน
a, b, c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

การทดลองปลูกเห็ดหิมาลัยหลังจากสปอร์เจริญเต็มถุง โดยผู้วิจัยเติมวัสดุคลุมผิวด้านบนของถุงและดำเนินการตามวิธีการทดลองจนเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะปลูก ได้ดอกเห็ดที่สมบูรณ์และ ทำการวิเคราะห์ได้ผลดังตารางที่ 4.2 ผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ทางสถิติของวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวมีอิทธิพลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% คือ จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้และความยาวของก้านดอก ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติดังนี้

การเจริญเป็นตุ่มเห็ดได้เร็วที่สุดมี 6 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรB, ใบไผ่สูตรB, ฟางข้าวสูตรA, หยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรB, ฟางข้าวสูตรB และฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 14.33, 14.67, 15.33, 15.67, 15.67 และ17.00 วัน ตามลำดับ ลำดับถัดมามี 2 ชนิดคือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรA และใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 20.00 และ20.67 วัน และลำดับสุดท้าย 2 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรB และหยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 27.67 และ28.00 วัน ชนิดที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้เร็วที่สุด 2 ชนิด คือ ฟางข้าวสูตรB และฟางข้าวสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 6.67 และ7.00 วัน ลำดับถัดมามี 5 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรB, ใบไผ่สูตรB, หยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรB, ใบไผ่สูตรA และฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 7.33, 7.33, 7.67, 7.67 และ8.00 วัน ตามลำดับ ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 8.67 วัน และลำดับสุดท้ายมี 2 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรB และหยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 10.33 และ10.67 วัน จำนวนดอกที่เก็บเกี่ยวได้มากที่สุด คือ ฟางข้าวสูตรB ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 4.3 ดอก ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 3.67 ดอก ลำดับถัดมามี 2 ชนิด คือ ฟางข้าวสูตรA และหยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรB ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 3.33 และ3.33 ดอก ลำดับถัดมามี 2 ชนิด คือ ใบไผ่สูตรB และฟางข้าว

ผสมหยวกกล้วยสูตรB ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 3.00 และ3.00 ดอก ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 2.67 ดอก ลำดับถัดมา คือ หยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 2.33 ดอก ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 2.00 ดอก และลำดับสุดท้ายคือ ใบไผ่สูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 1.67 ดอก ความยาวก้านของดอกเห็ดที่ยาวที่สุด คือ ฟางข้าวสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 15.12 เซนติเมตร ลำดับถัดมามี 2 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรB และฟางข้าวสูตรB ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 12.09 และ11.52 เซนติเมตร ลำดับถัดมามี 6 ชนิด คือ ใบไผ่สูตรA, หยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรA, หยวกกล้วยผสมใบไผ่สูตรB, ฟางข้าวผสมใบไผ่สูตรA, ฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรB และใบไผ่สูตรB ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 9.9, 9.84, 9.08, 8.65, 8.39 และ7.44 เซนติเมตร ตามลำดับ และลำดับสุดท้าย คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วยสูตรA ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 4.93 เซนติเมตร

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีทางสถิติที่วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวไม่มีอิทธิพลร่วมกัน และวัสดุคลุมผิวไม่มีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ P>0.05 โดยวัสดุปลูกมีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ P<0.05

วัสดุปลูก/วัสดุคลุมผิว	เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด (เซนติเมตร)	น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด (กรัม)	ค่าประสิทธิภาพการผลิต (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนรวม (เปอร์เซ็นต์)	ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B
ฟางข้าว	9.82±2.10^{a}	49.92±19.74^{a}	12.48±4.94^{a}	3.27±0.59^{a}	11.64±1.58^{a}
ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย	4.25±0.93^{c}	19.41±8.70^{b}	4.86±2.18^{b}	2.47±0.23^{b}	25.17±5.44^{c}
หยวกกล้วย	-	-	-	-	-
ฟางข้าวผสมใบไผ่	7.02±1.86^{b}	33.84±10.93^{ab}	8.46±2.73^{ab}	2.77±0.13^{ab}	17.73±6.89^{ab}
ใบไผ่	5.76±0.92^{bc}	29.72±15.05^{ab}	7.43±3.76^{ab}	1.33±0.77^{c}	20.36±4.75^{bc}
หยวกกล้วยผสมใบไผ่	5.49±2.10^{bc}	26.04±18.75^{ab}	6.51±4.69^{ab}	2.91±0.38^{ab}	20.88±2.92^{bc}

หมายเหตุ A คือ วัสดุคลุมผิวที่ไม่ผสมมูลไส้เดือน B คือ วัสดุคลุมผิวที่ผสมมูลไส้เดือน

a, b, c ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ผลลัพธ์ของการวิเคราะห์ทางสถิติดังตารางที่ 4.3 ของเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกของดอกเห็ด น้ำหนักผลผลิตของเห็ดสด ค่าประสิทธิภาพการผลิต โปรตีนรวมและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวไม่มีอิทธิพลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อทดสอบอิทธิพลของวัสดุคลุมผิวทั้งสูตรA และสูตรB นั้นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงควรเลือกใช้วัสดุคลุมผิวสูตรA ที่ไม่มีมูลไส้เดือน เพื่อลดต้นทุนการผลิต แต่จากการวิเคราะห์ทางสถิติวัสดุปลูกทั้ง 6 ชนิดนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่น 95% ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติดังนี้

เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกของดอกเห็ดที่มากที่สุด คือ ฟางข้าว ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 9.64 เซนติเมตร ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 7.02 เซนติเมตร ลำดับถัดมามี 2 ชนิด คือ ใบไผ่ และหยวกกล้วยผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 5.76 และ 5.49 เซนติเมตร ลำดับสุดท้าย คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 4.25 เซนติเมตร น้ำหนักผลผลิตเห็ดสดที่มีค่ามากที่สุด คือ ฟางข้าว ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 49.92 กรัม ลำดับถัดมามี 3 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่ ใบไผ่ และหยวกกล้วยผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 33.84, 29.72 และ26.04 กรัม ตามลำดับ ลำดับสุดท้าย คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 19.41 กรัม ค่าประสิทธิภาพการผลิตที่มีค่ามากที่สุด คือ ฟางข้าว ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 12.48 เปอร์เซ็นต์ ลำดับถัดมามี 3 ชนิด คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่ ใบไผ่ และหยวกกล้วยผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 8.46, 7.43 และ6.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับสุดท้าย คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 4.86 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนรวมที่มีค่ามากที่สุด คือ ฟางข้าว ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 3.27 เปอร์เซ็นต์ ลำดับถัดมามี 2 ชนิด คือ หยวกกล้วยผสมใบไผ่ และฟางข้าวผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 2.91 และ2.77 เปอร์เซ็นต์ ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมหยวกกล้วย ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 2.47 เปอร์เซ็นต์ ลำดับสุดท้าย คือ ใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 1.33 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงตามค่า IC50 ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ 86.86 เปอร์เซ็นต์ โดยวัสดุปลูกที่ให้ค่าที่มากที่สุด คือ ฟางข้าว ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 11.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (20.85เปอร์เซ็นต์) ลำดับถัดมา คือ ฟางข้าวผสมใบไผ่ ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 17.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (14.81 เปอร์เซ็นต์) และลำดับสุดท้ายมี 3 ชนิด คือ ใบไผ่ หยวกกล้วยผสมใบไผ่ และฟางข้าวผสมหยวกกล้วย ให้ค่าการวิเคราะห์ทางสถิติ คือ 20.36 (12.72 เปอร์เซ็นต์), 20.88 (12.87เปอร์เซ็นต์) และ25.17 (10.58 เปอร์เซ็นต์) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้จากตารางที่ 2 และตารางที่ 3 ในถุงเห็ดที่มีหยวกกล้วยเป็นวัสดุปลูกไม่มีการเจริญเป็นตุ่มเห็ดตลอดการทดลอง เนื่องจากหยวกกล้วยนั้นมีปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อราดำ และราเขียว เมื่อราแพร่กระจายทำให้หยวกกล้วยที่เป็นวัสดุปลูกถูกทำลายไม่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นดอกเห็ด (Stamets, 1993)

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิว ชนิดฟางข้าว สูตร A ที่ไม่ได้มีมูลไส้เดือนที่มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพาะ *Calocybe indica*

วัสดุปลูก/วัสดุคลุมผิว	จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด (วัน)	จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก (วัน)	จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้ (ดอก)	ความยาวของก้านดอก (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด (เซนติเมตร)	น้ำหนักผลผลิตเห็ดสด (กรัม)	ค่าประสิทธิภาพการผลิต (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีนรวม (เปอร์เซ็นต์)	ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
ฟางข้าว สูตร A	16.33	15.33	7.00	3.33	15.12	11.30	54.09	13.53	10.63

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ฟางข้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถนำมาเป็นวัสดุปลูกเห็ดหิมาลัยที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด ทั้งในทางกายภาพ เคมี และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดังตารางที่ 4.4 ซึ่งความเหมาะสมนี้สอดคล้องกับ Ragupathi *et. al.* (2016) และ Vijaykuma *et. al.* (2014) ที่รายงานว่าฟางข้าวเป็นวัสดุปลูกที่มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการเพาะ *Calocybe indica* ดังนั้นเพื่อความคุ้มค่าในการผลิตเห็ดหิมาลัยจึงควรเลือกใช้วัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวชนิด ฟางข้าว สูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการเจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (*Calocybe indica*) ในวัสดุปลูกทั้ง 6 ชนิดและวัสดุคลุมผิวทั้ง 2 ชนิด ได้ผลลัพธ์วิธีการเพาะให้ได้ดอกเห็ดที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ด้วยวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวที่ได้ประสิทธิภาพสูงสุด คือ วัสดุปลูกชนิดฟางข้าว โดยใช้วัสดุคลุมผิวสูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน ซึ่งสปอร์เดินจนเต็มถุงเร็วที่สุดได้ค่า 16.33 วัน มีความยาวของก้านดอกสูงสุดคือ 15.12 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ดกว้างสุดที่ 11.30 เซนติเมตร มีน้ำหนักผลผลิตเห็ดสดรวมมากที่สุดคือ 54.09 กรัม ได้ค่าประสิทธิภาพการผลิตดีที่สุดอยู่ที่ 13.53 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC50 values) โดยใช้จำนวนสารสกัดน้อยที่สุดอยู่ที่ 10.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ยังมีการวิเคราะห์ค่าของ จำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด จำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก จำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้ และการวัดประเมินผลทางเคมีโดยหาโปรตีนรวม ซึ่งวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวชนิด ฟางข้าว สูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน ให้ค่าการวิเคราะห์แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญจากชนิดที่ให้ค่าการวิเคราะห์มากที่สุด โดยอยู่ในระดับที่สูงสุดเช่นเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองทางกายภาพ จะเห็นได้ว่าการเจริญของดอกเห็ดมีผลของการเจริญได้ไม่เต็มที่ตามรายงานของ Senthilnambi *et. al*. (2011) ได้รายงานว่าเดือนที่มีอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณฝนที่อยู่ในระดับต่ำกว่าเดือนอื่นๆ จะให้ค่าน้ำหนักรวม จำนวนดอกเห็ด ผลผลิต ประสิทธิภาพการผลิตที่ต่ำกว่าเดือนอื่นๆ การศึกษาการทดลองในครั้งนี้ได้เริ่มดำเนินการระหว่างเดือนธันวาคม ปี 2560 ถึงเดือน มีนาคม ปี2561 ซึ่งช่วงเวลานั้นเกิดความแปรปรวนของสภาพอากาศในประเทศไทย และจากการทดลองในขั้นตอนการดำเนินการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในวัสดุปลูกโดยใช้หม้อนึงความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งอาจเป็นระยะเวลาที่ไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อปนเปื้อนทั้งหมด ซึ่งเห็นได้จากรายงานของ Lakshmipathy *et al*. (2012) แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่ 60±2.9 ในระยะเวลา 30 นาที แต่เมื่อใช้หม้อนึงความดันไอที่ระยะเวลา 90 นาที แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่ 0.5±0.019

เอกสารอ้างอิง

ชาญยุทธ์ ภาณุทัต, จำนงค์ อุทัยบุตร, นงนุช แตงทรัพย์. (2546). โครงการพัฒนาการผลิตเห็ดครบวงจร. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ถาวร มณียศ, ปรีชา ลินมา, เล็ก สิงห์เล็ก, ภานุวรรธน์ ชูเลาตระกูล, ชาญณรงค์ สมาวงษ์, จรัญ เฉลิมพร, ชัยชาญ เข็มทอง, คำแปงไชยป้อม. (2547). เห็ดเศรษฐกิจ. กรุงเทพมหานคร: อภิชาติศรีสอาด.

ธิดารัตน์ เอกสิทธิกุล, สัญญา กุดั่น. (2554). การพัฒนาคุณค่าของนวัตกรรมเทคโนโลยีสารชีวภาพไคโตซานในการเพาะเห็ดจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรฟางข้าว ด้วยรูปแบบการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชน เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของชุมชนอย่างยั่งยืน. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. (2538). เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

ปราณี นันทศรี. (2549). วิธีปฏิบัติการมาตรฐานพืชสมุนไพรและอาหาร. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์.

ปราณีรัตน์ แสงเกษตรชัย. (2551) เอกสารประกอบการสอนวิชา เคมีคลินิก 1 (Clinical Chemistry) เรื่อง Oxidative stress and adverse human health effffects สำหรับนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต พ.ศ.2551

พรศิลป์ สีเผือก และคมสัน นันทสุนทร. (2548). การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มศักยาพการเพาะเห็ดของชุมชน : กรณีศึกษาจังหวัดนครศรีธรรมราช. นครศรีธรรมราช: สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา.

ศุภชัย รตโนภาส. (2540). การผลิตเห็ด (Mushroom production). กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. (2535). เห็ดเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agents. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Amin, R., Khair, A., Alam, N., Lee, T.S. (2010). Effect of different substrates and casing materials on the growth and yield of *Calocybe indica*. Mycobiology, 97-101.

Atrooz, O. M. (2009). The antioxidant activity and polyphenolic contents of different plant seeds extracts. Pakistan journal of biological sciences 12, 1063-1068.

Barros, L., Falcao, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem 111:61–66

Bhagavan, NV. (2002) Medical biochemistry. Elsevier, Amsterdam.

Bokaria, K., Balsundram, S. K., and Kaphle, K. (2014). Commercial production of milky mushroom (*Calocybe indica*). Merit Research Journal of Agricultural Science and Soil Sciences. 2, 32- 37.

Çaglarirmak, N. (2007).The nutrients of exotic mushrooms *Lentinulaedodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. Food Chem, 105: 1188–1194.

Giardi, MT., Rea, G., Berra, B. (2010) Bio Farms for Nutraceuticals: functional food and safety control by biosensors. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.

Glevitzky, M., Pop, M., Brusturean, G. A., Bogdan, I., Calisevici, M. (2008) Efficent use of antioxidants to preserve fruit juice. Rev Chim (Bucharest) 59:1291-1295.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end (of the beginning). Society For Free Radical Biology and Medicine 31: 261-272.

Iwalokun, B.A., U.A.Usen, A. A. Otunba and D. K. Olukoya, (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. AJB, 6(15): 1732-1739.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Khan, S.M., Nawaz, A., Malik, W., Javed, N., Yasmin, T., Rehman., M. U., Qayyum, A., Iqbal, Q., Ahmad, T., and Khan, A.A. (2011). morphological and molecular characterization of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). AJB, 10 (14): 2638-2643.

Joanna, M., Lynch, David, M., Barbano. (1999). Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. LYNCH & BARBANO: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL, 1389-1398.

Jones, J.B.Jr. (1991). Kjeldahl method for nitrogen determination. The United States of America: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

Lakshmipathy, G., Jayakumar, A., M, abhilash., S, Prema Raj. (2012). Optimization of growth parameters for increased yield of the edible mushroom *Calocybe indica*. African Journal of Biotechnology, 7701-7710.

Mello, LD., and Kubota, LT. (2007) Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. Talanta 72: 335-348.

Mohora, M., (2006) Biochimie medicala. Editura Niculescu, Bucuresti

Niki, E., Shimaski, H., Mino, M. (1994) Antioxidantism—free radical and biological defense Tokyo.

Pisoschi, AM., Danet, AF., and Kalinowski, S. (2008) Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry. JAMMC 8.

Pisoschi, AM., Negulescu, Gh. P., and Pisoschi, A. (2010) Ascorbic acid determination by an amperometric ascorbate oxidase-based biosensor. Rev Chim (Bucharest) 61: 339-344.

Pisoschi, AM., Pop, A., Negulescu, Gh. P., and Pisoschi, A. (2011) Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. Molecules 16: 1349-1365.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Popa, CV., Danet, AF., Jipa, S., and Zaharescu, T. (2010) Determination of total antioxidant activity of wines using a flow injection method with chemiluminescence detection. Rev Chim (Bucharest) 61: 11-16.

Purkayastha, R.P., and Chandra, A. (1974) New species of edible mushroom from India. Trans. Br. Mycol. Soc. 62 : 415-418.

Purkayastha, R.P., and Nayak, D. (1981) A new method of cultivation of *Calocybe indica*. Taiwan Mush., 3: 14-18.

Purkayastha, R.P., (1984-85) Cultivation of *Calocybe indica* P & C Indian J., Mush. 10-11 : 12-17.

Ragupathi, V., Kumerasan, S., Selvaraju, S., Karthikeyan, V. (2016). Optimizing the growth conditions and adopting new methods growing oyster and milky mushroom in same conditions. International Journal of Herbal Medicine, 01-04.

Senthilnambi, D., Eswaran A., Balabaskar P. (2011). Cultivation of *Calocybe indica* (P and C) during different months and influence of temperature and relative humidity on the yield of summer mushroom. African Journal of Agricultural Research, 771-773.

Stamets, P. (1993). Growing gourmet & medicinal mushrooms. hong kong: Ten Speed Press.

Subbiah, K. A., Balan, V. (2015). A comprehensive review of tropical milky white mushroom (*Calocybe indica* P&C). Mycobiology, 184-194.

Tomita, IN., Manzoli, A., Fertonani, FL., and Yamanaka, H. (2005) Amperometric biosensor for ascorbic acid. Eclet Quím 30: 37-43.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

van Acker, A. A., van Acker, A. B. E., Kramer, K., Haenen, R. M. M., Bast, A and Wim van der Vijgh, J. F. (2000). 7-Monohydroxyethylrutoside Protects against Chronic Doxorubicininduced Cardiotoxicity When Administered Only Once Per Week. Clinical Cancer Research, (1337-1341).

Vijaykuma, G., John, P., Ganesh, K., (2014). Selection of different substrates for the cultivation of milky mushroom (*Calocybe indica* P & C). Indian Journal of Traditional Knowledge (IJTK) , 434-436.

Voet, D., and Voet, J. (1995) Biochemistry. (2ndedn), John Wiley & Sons, New York

Wawrzyniak, J., Ryniecki, A., and Zembrzuski, W. (2005) Application of voltammetry to determinevitamin C in apple juices. Acta Sci Pol Technol Aliment 42: 5-16.

Yang, J.H., Lin, H.C., and Mau, J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chem, 77: 229-235.

Zahid, K., Barua, S., and Haque, S.M.I. (2010). Proximate composition and mineral content of selected edible mushroom varieties of bangladesh. Bangladesh Journal of Nutrition,Vol., 22-23: 61-68

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1.1 สารเคมีที่ใช้

1.1.1 Potato dextrose agar (PDA) Powder

1.1.2 น้ำกลั่น

1.2 ขั้นตอนการเตรียม

1.2.1 ชั่งผง PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร

1.2.2 นำเข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. การเตรียมสารละลาย Stock DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลต่อลิตร เตรียม 200 มิลลิลิตร ละลายในเมทานอลด้วยเครื่อง Sonicator bath

2.1 สารเคมีที่ใช้

2.1.1 สาร DPPH ชนิดผง

2.1.2 เมทานอล

2.2 ขั้นตอนการเตรียม

2.2.1 ชั่งผง DPPH เพื่อเตรียมความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลต่อลิตร ชั่ง 0.0047 กรัม เตรียม 200 มิลลิลิตร

2.2.2 ละลายในเมทานอลด้วยเครื่อง Sonicator bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ละลายให้หมด ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

3. การเตรียม NaOH ความเข้มข้น 40% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3.1 สารเคมีที่ใช้

3.1.1 สาร NaOH ชนิดเม็ด

3.1.2 น้ำกลั่น

3.2. ขั้นตอนการเตรียม

3.2.1 ชั่งสาร NaOH 200 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจน NaOH ละลายในน้ำกลั่นจนหมด

ภาคผนวก ก (ต่อ)

4. การเตรียมสาร Boric acid ความเข้มข้น 4% ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

4.1 สารเคมีที่ใช้

4.1.1 Boric acid

4.1.2 น้ำกลั่น

4.2 ขั้นตอนการเตรียม

4.2.1 ชั่ง Boric acid 10 กรัม ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิสูง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสาร HCL ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

5.1 สารเคมีที่ใช้

5.1.1 conc. HCL

5.1.2 น้ำกลั่น

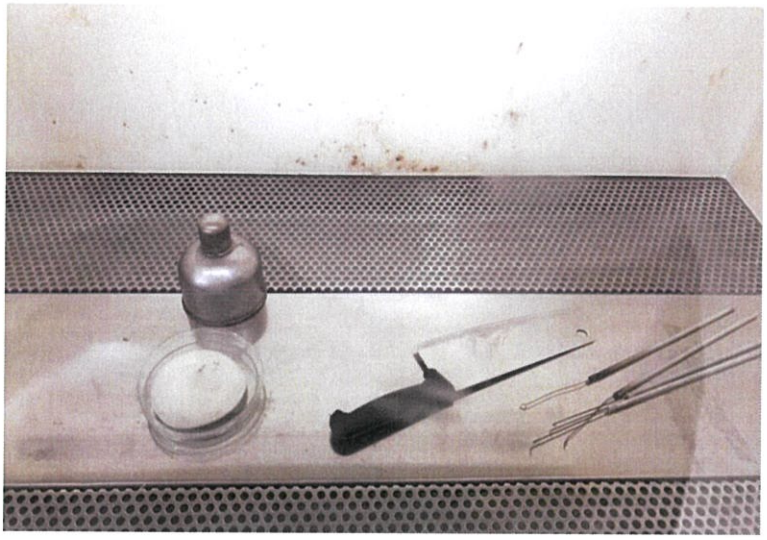
5.2 ขั้นตอนการเตรียม

5.2.1 ปิเปต conc. HCL 2.1 มิลลิลิตร หยดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

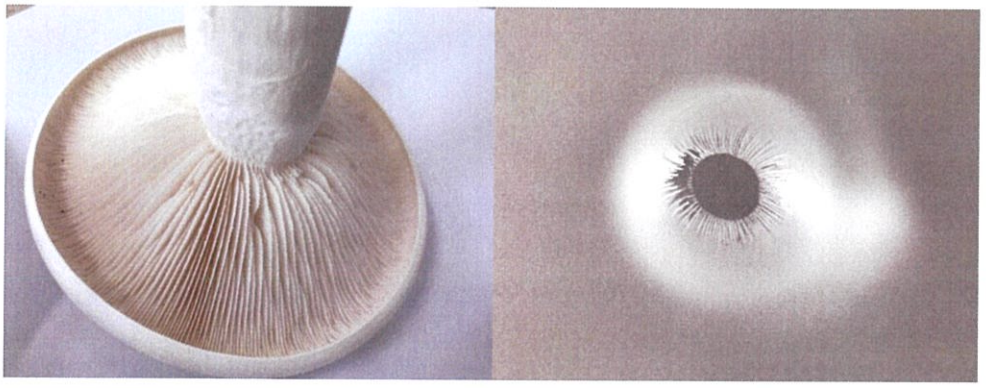
ภาคผนวก ข

1. ขั้นตอนการแยกเชื้อเห็ดหิมาลัยบริสุทธิ์

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์จากสปอร์

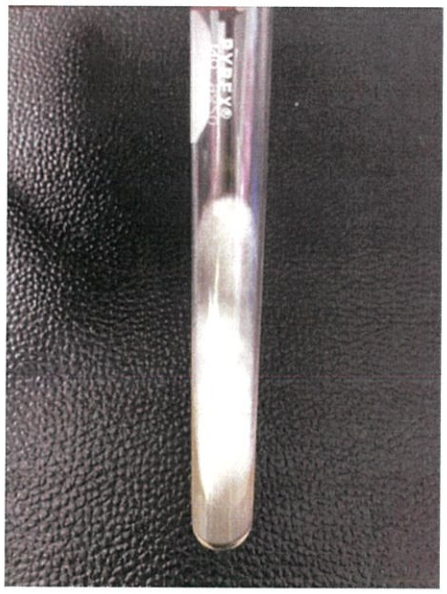


1.2 ลักษณะของกลีบใต้หมวกเห็ด และสีของสปอร์



ภาคผนวก ข (ต่อ)

1.3 เชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดหิมาลัยที่แยกได้จากสปอร์



1.4 เชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดหิมาลัยที่แยกได้จากก้านเห็ด

ภาคผนวก ค

1. การเพิ่มจำนวนเส้นใยเห็ดหิมาลัยโดยเลือกใช้ข้าวฟ่างซึ่งเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย

1.1 เส้นใยข้าวฟ่างที่คัดเมล็ดแล้วนำไปเกลี่ยบางๆ รอจนแห้งแล้วกรอกลงขวดนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อ

1.2 รอเย็นจึงนำชิ้นวุ้นของเชื้อเห็ดหิมาลัยบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหาร PDA ใส่ลงในขวดข้าวฟ่างบ่มในที่มืดรอจนเชื้อเจริญจนเต็มขวด

ภาคผนวก ง

1. การผลิตวัสดุคลุมผิวด้านบนก้อนเชื้อเห็ด (casing)

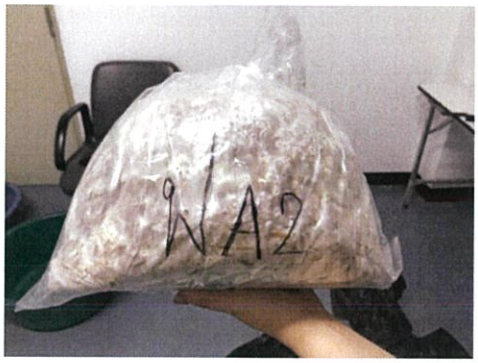
1.1 วัสดุคลุมผิวสูตร A ที่ไม่มีมูลไส้เดือน ประกอบด้วย แกลบดำ ขุยมะพร้าว และยิปซั่ม

1.2 วัสดุคลุมผิวสูตร B ที่มีมูลไส้เดือนประกอบด้วย แกลบดำ ขุยมะพร้าว ยิปซั่ม และมูลไส้เดือน

ภาคผนวก จ

1. รูปภาพการวัดผลทางกายภาพ

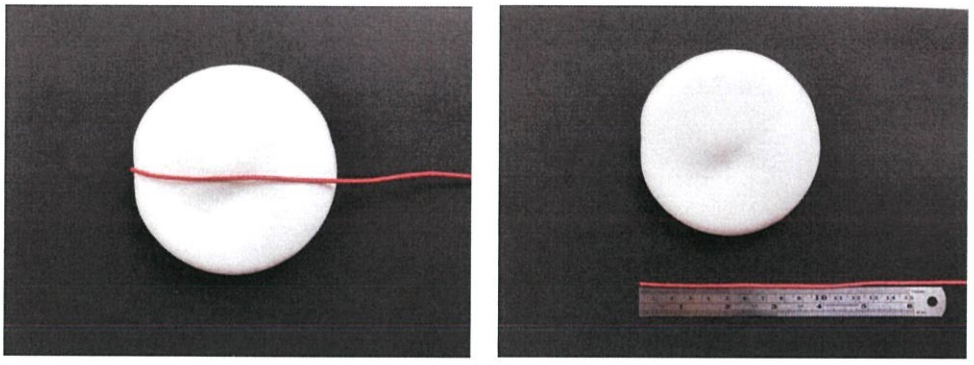
1.1 สปอร์เดินจนเต็มถุง (Spawn run)



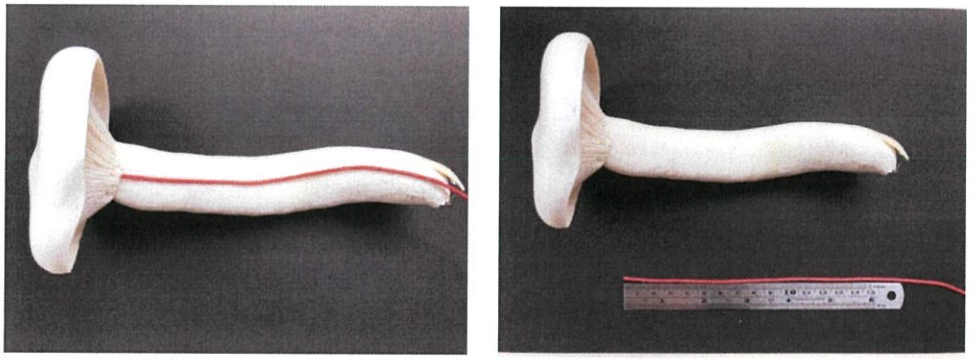
1.2 พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด (Day pinhead formation)

ภาคผนวก จ (ต่อ)

1.3 วิธีการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด (Pileus diameter ; cm)



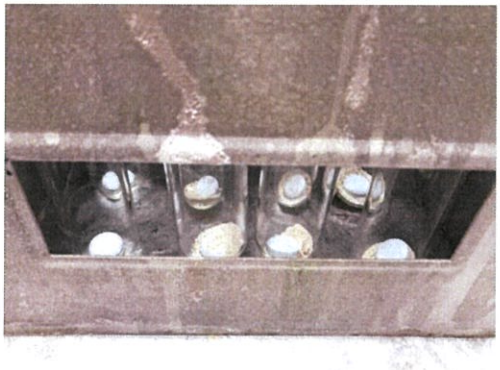
1.4 วิธีการวัดความยาวของก้านดอก (Length of stalk ; cm)

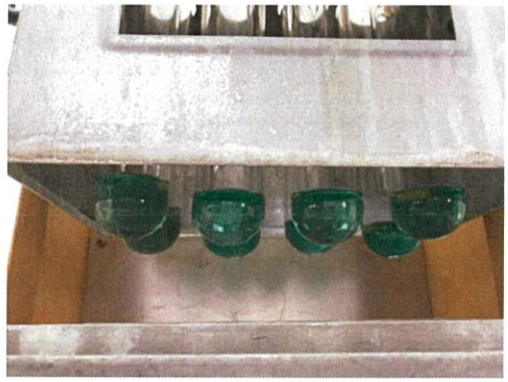


ภาคผนวก ฉ

1. รูปภาพการวัดทางเคมี

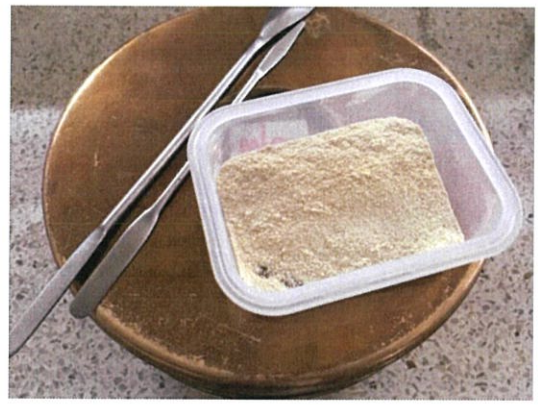
1.1 รูปภาพการวัดผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม (Crude protein)





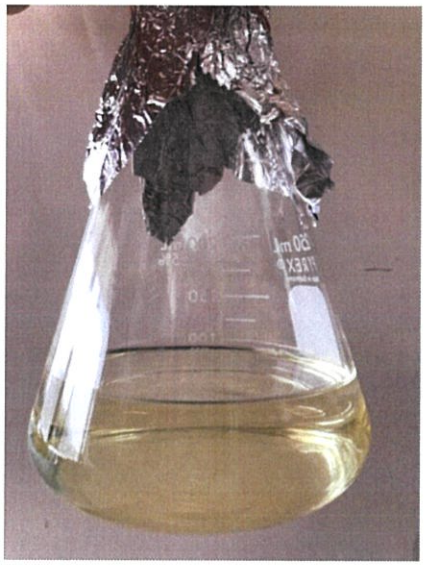
ภาคผนวก ฉ (ต่อ)

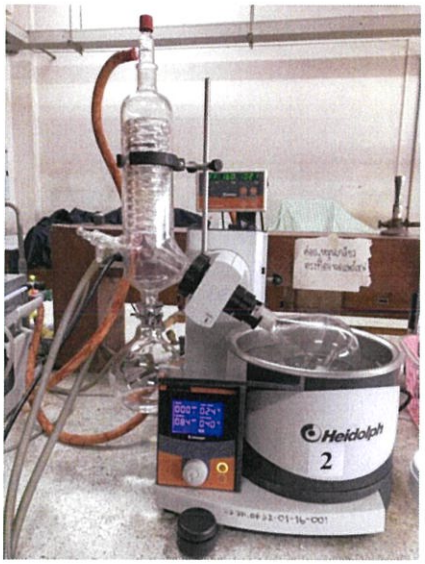
1.2 รูปภาพวิธีการหาความสามารถในการจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

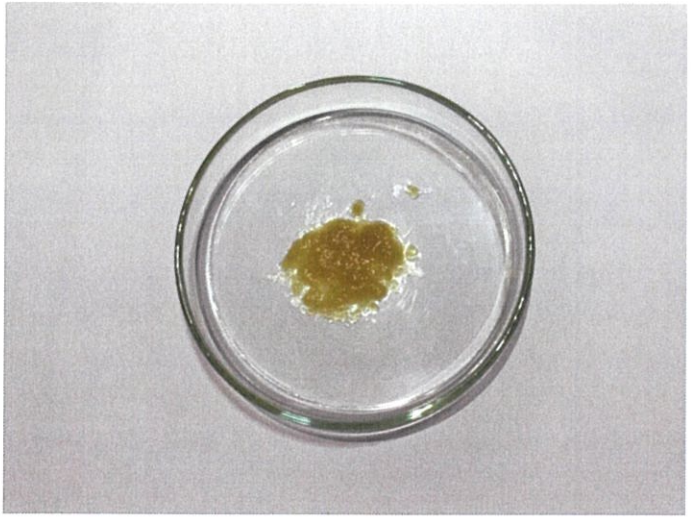


ภาคผนวก ฉ (ต่อ)

1.2 รูปภาพวิธีการหาความสามารถในการจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ต่อ)

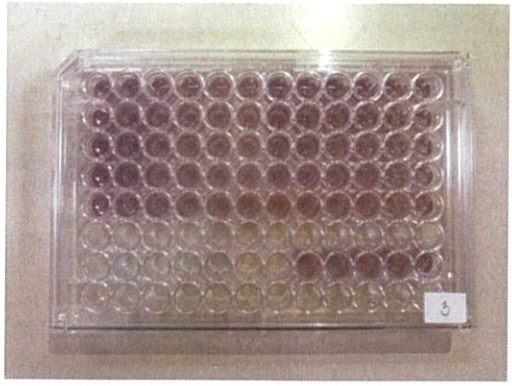






ภาคผนวก ฉ (ต่อ)

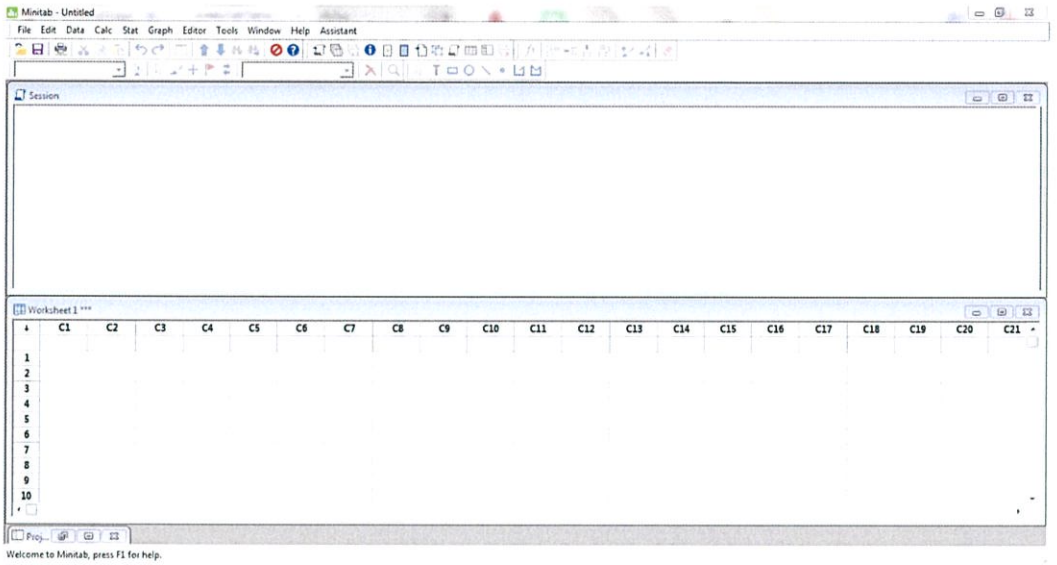
1.3 ขั้นตอนการหาความสามารถในการจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยการใช้เครื่องวัด spectrophotometer 96 well



ภาคผนวก ช

1. การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) และ One-Way ANOVA

1.1 หน้าต่างโปรแกรม Minitab version 18.1



ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.2 การวิเคราะห์แบบ One-Way ANOVA ของจำนวนวันที่สปอร์เดินจนเต็มถุง (Spawn run)

One-way ANOVA: C2 versus C1

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	$\alpha = 0.05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	1, 2, 3, 4, 5, 6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	404.944	80.9889	242.97	0.000
Error	12	4.000	0.3333		
Total	17	408.944			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.577350	99.02%	98.61%	97.80%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
5	3	28.667	A
4	3	28.667	A
3	3	27.667	A
2	3	27.667	A
6	3	20.667	B
1	3	16.333	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
1	3	16.333	0.577	(15.607, 17.060)
2	3	27.667	0.577	(26.940, 28.393)
3	3	27.667	0.577	(26.940, 28.393)
4	3	28.667	0.577	(27.940, 29.393)
5	3	28.667	0.577	(27.940, 29.393)
6	3	20.667	0.577	(19.940, 21.393)

Pooled StDev = 0.577350

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.3 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของจำนวนวันที่พบการเจริญเป็นตุ่มเห็ด (Day pinhead formation)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	2124.92	424.983	413.50	0.000
C2	1	42.25	42.250	41.11	0.000
C1*C2	5	338.92	67.783	65.95	0.000
Error	24	24.67	1.028		
Total	35	2530.75			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.01379	99.03%	98.58%	97.81%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1*C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1*C2	N	Mean	Grouping			
6 1	3	28.0000	A			
4 2	3	27.6667	A			
5 1	3	20.6667		B		
4 1	3	20.0000		B		
2 1	3	17.0000			C	
1 2	3	15.6667			C	
6 2	3	15.6667			C	
1 1	3	15.3333			C	
5 2	3	14.6667			C	
2 2	3	14.3333			C	
3 1	3	0.0000				D
3 2	3	0.0000				D

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Results for C1 = 1

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	15.333	0.667	1.155	14.000	14.000	16.000	16.000	16.000
	2	3	0	15.667	0.333	0.577	15.000	15.000	16.000	16.000	16.000

Results for C1 = 2

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	17.000	0.000000	0.000000	17.000	17.000	17.000	17.000	17.000
	2	3	0	14.333	0.333	0.577	14.000	14.000	14.000	15.000	15.000

Results for C1 = 3

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Variable	C2	Maximum
C3	1	0.000000
	2	0.000000

Results for C1 = 4

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	20.000	0.577	1.000	19.000	19.000	20.000	21.000	21.000
	2	3	0	27.667	0.882	1.528	26.000	26.000	28.000	29.000	29.000

Results for C1 = 5

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	20.67	1.20	2.08	19.00	19.00	20.00	23.00	23.00
	2	3	0	14.667	0.333	0.577	14.000	14.000	15.000	15.000	15.000

Results for C1 = 6

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	28.000	0.577	1.000	27.000	27.000	28.000	29.000	29.000
	2	3	0	15.667	0.667	1.155	15.000	15.000	15.000	17.000	17.000

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.4 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของจำนวนวันที่สามารถเก็บดอกเห็ดได้ครั้งแรก (First harvest)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	362.222	72.4444	326.00	0.000
C2	1	1.778	1.7778	8.00	0.009
C1*C2	5	16.889	3.3778	15.20	0.000
Error	24	5.333	0.2222		
Total	35	386.222			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.471405	98.62%	97.99%	96.89%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1*C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1*C2	N	Mean	Grouping		
6 1	3	10.6667	A		
4 2	3	10.3333	A		
4 1	3	8.6667		B	
2 1	3	8.0000		B	C
5 1	3	7.6667		B	C
6 2	3	7.6667		B	C
5 2	3	7.3333		B	C
2 2	3	7.3333		B	C
1 1	3	7.0000			C
1 2	3	6.6667			C
3 1	3	0.0000			D
3 2	3	0.0000			D

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Results for C1 = 1

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	7.0000	0.000000	0.000000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
	2	3	0	6.667	0.333	0.577	6.000	6.000	7.000	7.000	7.000

Results for C1 = 2

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	8.0000	0.000000	0.000000	8.0000	8.0000	8.0000	8.0000	8.0000
	2	3	0	7.333	0.333	0.577	7.000	7.000	7.000	8.000	8.000

Results for C1 = 3

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Variable	C2	Maximum
C3	1	0.000000
	2	0.000000

Results for C1 = 4

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	8.667	0.333	0.577	8.000	8.000	9.000	9.000	9.000
	2	3	0	10.333	0.333	0.577	10.000	10.000	10.000	11.000	11.000

Results for C1 = 5

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	7.667	0.333	0.577	7.000	7.000	8.000	8.000	8.000
	2	3	0	7.333	0.333	0.577	7.000	7.000	7.000	8.000	8.000

Results for C1 = 6

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	10.667	0.333	0.577	10.000	10.000	11.000	11.000	11.000
	2	3	0	7.667	0.333	0.577	7.000	7.000	8.000	8.000	8.000

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.5 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของจำนวนดอกเห็ดที่เก็บเกี่ยวได้ (Number of fruit bodies)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	51.556	10.3111	53.03	0.000
C2	1	2.778	2.7778	14.29	0.001
C1*C2	5	5.889	1.1778	6.06	0.001
Error	24	4.667	0.1944		
Total	35	64.889			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.440959	92.81%	89.51%	83.82%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1*C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1*C2	N	Mean	Grouping					
1 2	3	4.33333	A					
4 1	3	3.66667	A	B				
1 1	3	3.33333	A	B	C			
6 2	3	3.33333	A	B	C			
5 2	3	3.00000		B	C	D		
2 2	3	3.00000		B	C	D		
4 2	3	2.66667		B	C	D	E	
6 1	3	2.33333			C	D	E	
2 1	3	2.00000				D	E	
5 1	3	1.66667					E	
3 2	3	0.00000						F
3 1	3	0.00000						F

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Results for C1 = 1

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	3.333	0.333	0.577	3.000	3.000	3.000	4.000	4.000
	2	3	0	4.333	0.333	0.577	4.000	4.000	4.000	5.000	5.000

Results for C1 = 2

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	2.0000	0.000000	0.000000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
	2	3	0	3.0000	0.000000	0.000000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000

Results for C1 = 3

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Variable	C2	Maximum
C3	1	0.000000
	2	0.000000

Results for C1 = 4

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	3.667	0.333	0.577	3.000	3.000	4.000	4.000	4.000
	2	3	0	2.667	0.333	0.577	2.000	2.000	3.000	3.000	3.000

Results for C1 = 5

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	1.667	0.333	0.577	1.000	1.000	2.000	2.000	2.000
	2	3	0	3.0000	0.000000	0.000000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000

Results for C1 = 6

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	2.333	0.333	0.577	2.000	2.000	2.000	3.000	3.000
	2	3	0	3.333	0.333	0.577	3.000	3.000	3.000	4.000	4.000

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.6 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของความยาวของก้านดอก (Length of stalk)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	613.477	122.695	39.46	0.000
C2	1	0.002	0.002	0.00	0.981
C1*C2	5	64.953	12.991	4.18	0.007
Error	24	74.629	3.110		
Total	35	753.060			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.76339	90.09%	85.55%	77.70%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1*C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1*C2	N	Mean	Grouping		
1 1	3	15.1167	A		
4 2	3	12.0900	A	B	
1 2	3	11.5200	A	B	
5 1	3	9.9000		B	C
6 1	3	9.8400		B	C
6 2	3	9.0833		B	C
4 1	3	8.6500		B	C
2 2	3	8.3867		B	C
5 2	3	7.4433		B	C
2 1	3	4.9333			C D
3 2	3	0.0000			D
3 1	3	0.0000			D

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Results for C1 = 1

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	15.117	0.760	1.317	13.600	13.600	15.780	15.970	15.970
	2	3	0	11.520	0.646	1.119	10.260	10.260	11.900	12.400	12.400

Results for C1 = 2

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	4.93	1.02	1.77	2.95	2.95	5.50	6.35	6.35
	2	3	0	8.39	1.78	3.08	5.90	5.90	7.43	11.83	11.83

Results for C1 = 3

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

Variable	C2	Maximum
C3	1	0.000000
	2	0.000000

Results for C1 = 4

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	8.650	0.738	1.278	7.180	7.180	9.270	9.500	9.500
	2	3	0	12.09	1.27	2.21	10.17	10.17	11.60	14.50	14.50

Results for C1 = 5

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	9.900	0.929	1.609	8.200	8.200	10.100	11.400	11.400
	2	3	0	7.443	0.366	0.634	6.770	6.770	7.530	8.030	8.030

Results for C1 = 6

Statistics

Variable	C2	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
C3	1	3	0	9.84	1.70	2.94	7.75	7.75	8.57	13.20	13.20
	2	3	0	9.08	1.09	1.89	7.93	7.93	8.05	11.27	11.27

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.7 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกเห็ด (Pileus diameter)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	316.399	63.2799	33.23	0.000
C2	1	0.043	0.0427	0.02	0.882
C1*C2	5	23.986	4.7971	2.52	0.057
Error	24	45.703	1.9043		
Total	35	386.131			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.37997	88.16%	82.74%	73.37%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
1	6	9.81500	A		
4	6	7.02000		B	
5	6	5.76167		B	C
6	6	5.48833		B	C
2	6	4.25167			C
3	6	0.00000			D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C2	N	Mean	Grouping
1	18	5.42389	A
2	18	5.35500	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Statistics

Variable	C1	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	6	0	9.815	0.856	2.096	6.040	8.522	10.085	11.598
	2	6	0	4.252	0.381	0.934	3.350	3.687	4.015	4.732
	3	6	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	4	6	0	7.020	0.758	1.858	3.730	5.485	7.650	8.480
	5	6	0	5.762	0.373	0.915	4.700	5.127	5.500	6.550
	6	6	0	5.488	0.856	2.096	2.200	3.835	5.550	7.337

Variable	C1	Maximum
C3	1	11.800
	2	6.030
	3	0.000000
	4	8.570
	5	7.300
	6	8.200

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.8 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของน้ำหนักผลผลิตเห็ดสด (Total mushroom yield)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	8192.1	1638.41	8.05	0.000
C2	1	13.8	13.80	0.07	0.797
C1*C2	5	915.7	183.13	0.90	0.497
Error	24	4884.6	203.53		
Total	35	14006.1			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
14.2662	65.13%	49.14%	21.53%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
1	6	49.9200	A		
4	6	33.8350	A	B	
5	6	29.7200	A	B	
6	6	26.0433	A	B	
2	6	19.4133		B	C
3	6	0.0000			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C2	N	Mean	Grouping
1	18	27.1078	A
2	18	25.8694	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Statistics

Variable	C1	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	6	0	49.92	8.06	19.74	21.00	31.70	53.25	63.81
	2	6	0	19.41	3.55	8.70	9.50	13.36	16.41	27.97
	3	6	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	4	6	0	33.84	4.46	10.93	13.00	27.75	36.67	40.75
	5	6	0	29.72	6.14	15.05	11.43	16.41	27.94	43.16
	6	6	0	26.04	7.65	18.75	8.25	8.31	24.53	38.53

Variable	C1	Maximum
C3	1	77.50
	2	33.30
	3	0.000000
	4	44.50
	5	53.10
	6	58.87

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.9 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของค่าประสิทธิภาพการผลิต (Biological efficiency)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	512.168	102.434	8.05	0.000
C2	1	0.865	0.865	0.07	0.797
C1*C2	5	57.235	11.447	0.90	0.498
Error	24	305.487	12.729		
Total	35	875.754			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
3.56772	65.12%	49.13%	21.51%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
1	6	12.4817	A		
4	6	8.4617	A	B	
5	6	7.4317	A	B	
6	6	6.5100	A	B	
2	6	4.8550		B	C
3	6	0.0000			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C2	N	Mean	Grouping
1	18	6.77833	A
2	18	6.46833	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Statistics

Variable	C1	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	6	0	12.48	2.02	4.94	5.25	7.93	13.32	15.95
	2	6	0	4.855	0.888	2.176	2.380	3.340	4.105	6.995
	3	6	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	4	6	0	8.46	1.12	2.73	3.25	6.94	9.17	10.19
	5	6	0	7.43	1.54	3.76	2.86	4.10	6.98	10.79
	6	6	0	6.51	1.91	4.69	2.06	2.08	6.13	9.63

Variable	C1	Maximum
C3	1	19.38
	2	8.330
	3	0.000000
	4	11.13
	5	13.28
	6	14.72

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.10 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของการวัดและประเมินผลทางเคมี โดยหาโปรตีนรวม (Crude protein)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	45.6458	9.12916	55.30	0.000
C2	1	0.0348	0.03484	0.21	0.650
C1*C2	5	1.7730	0.35460	2.15	0.094
Error	24	3.9620	0.16508		
Total	35	51.4157			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.406304	92.29%	88.76%	82.66%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
1	6	3.26667	A		
6	6	2.91000	A	B	
4	6	2.77000	A	B	
2	6	2.47000		B	
5	6	1.32667			C
3	6	0.00000			D

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C2	N	Mean	Grouping
2	18	2.15500	A
1	18	2.09278	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Statistics

Variable	C1	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	6	0	3.267	0.241	0.589	2.600	2.773	3.125	3.890
	2	6	0	2.4700	0.0929	0.2276	2.1000	2.2950	2.5000	2.6800
	3	6	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	4	6	0	2.7700	0.0514	0.1259	2.6500	2.6500	2.7400	2.9050
	5	6	0	1.327	0.315	0.771	0.350	0.612	1.355	1.925
	6	6	0	2.910	0.155	0.379	2.390	2.585	2.930	3.245

Variable	C1	Maximum
C3	1	4.100
	2	2.6800
	3	0.000000
	4	2.9500
	5	2.450
	6	3.350

ภาคผนวก ช (ต่อ)

1.11 การวิเคราะห์แบบ Factorial Experiments in Completely Randomized Design (CRD) ของการวัดและประเมินผลความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH scavenging activity)

General Linear Model: C3 versus C1, C2

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
C1	Fixed	6	1, 2, 3, 4, 5, 6
C2	Fixed	2	1, 2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	2429.65	485.931	27.10	0.000
C2	1	4.88	4.884	0.27	0.607
C1*C2	5	117.78	23.556	1.31	0.292
Error	24	430.32	17.930		
Total	35	2982.64			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
4.23437	85.57%	78.96%	67.54%

Comparisons for C3

Tukey Pairwise Comparisons: C1

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
2	6	25.1717	A		
6	6	20.8817	A		
5	6	20.3567	A		
4	6	17.7267	A	B	
1	6	11.6367		B	
3	6	0.0000			C

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: C2

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C2	N	Mean	Grouping
1	18	16.3306	A
2	18	15.5939	A

Means that do not share a letter are significantly different.

ภาคผนวก ช (ต่อ)

Descriptive Statistics: C3

Statistics

Variable	C1	N	N*	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
C3	1	6	0	11.637	0.647	1.584	10.020	10.260	11.425	12.737
	2	6	0	25.17	2.22	5.44	16.39	19.71	27.09	29.45
	3	6	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	4	6	0	17.73	2.81	6.89	14.08	14.50	15.06	19.78
	5	6	0	20.36	1.94	4.75	17.33	17.93	18.87	21.73
	6	6	0	20.88	1.19	2.92	17.48	18.28	20.68	23.10

Variable	C1	Maximum
C3	1	14.440
	2	30.56
	3	0.000000
	4	31.74
	5	29.96
	6	25.67

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว ศศิวิมล เฉลยบุญ รหัสประจำตัว 57050898

นาย/นาง/นางสาว ศศิวิมล ทองหงส์ รหัสประจำตัว 57050899

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา เรื่อง

ชื่อภาษาไทย ผลการแจริญเติบโตของเห็ดหิมาลัย (Calocybe indica) ในวัสดุปลูกและวัสดุคลุมผิวหน้าแตกต่างกัน

ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of different substrates and casing materials on the growth of milky mushroom.

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 0.39 % หรือโปรแกรม Turnitin .....%

ลงชื่อ ศศิวิมล เฉลยบุญ ลงชื่อ ศศิวิมล ทองหงส์

(ศศิวิมล เฉลยบุญ) (ศศิวิมล ทองหงส์)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ศ. / รศ. / ผศ. / ดร. / อ. ชิงชล เสียงสนั่น อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ..... ลงชื่อ..... ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม