รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การผลิตสารพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดสมุนไพรพื้นเมืองภาคใต้ในอาหารเหลวจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

(Polysaccharides Production of Local Medicinal Mushroom of Southern Thailand in Submerged Culture from Palm Oil Mill Effluent)

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ

ดร.ณัฐธิดา สุวรรณโณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2555-2556

รหัส ENV 5500075

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจชนิดของเห็ดสมุนไพรในพื้นที่ภาคใต้ และประยุกต์ใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นสารอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร จากผลการทดลองศึกษาอัตราการเจริญของเส้นใย และวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนของเห็ดสมุนไพรที่คัดแยกได้ 15 สายพันธุ์จากแหล่งธรรมชาติในสามจังหวัดของภาคใต้ คือ สงขลา พัทลุง และสตูล พบว่าเห็ดดันหมีม่วงดำ (*Daldania concentrica*) มีอัตราการเจริญของโคโลนีสูงสุด 9.0 เซนติเมตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 7 วันในขณะที่สารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนพบปริมาณสูงสุดในเห็ดหลินเจือขอบเหลือง (*Ganoderma calidophilum*) คือ 1,230 มก./ลิตร และ 920 มก./ลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้แก่ ค่าพีเอช 7.93 ซีโอดี 7,286 มก./ลิตร ของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด 11,720 มก./ลิตร ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด 1,900มก./ลิตร คาร์โบไฮเดรต 4.30 มก./ลิตร ปริมาณแร่ธาตุ ไนโตรเจนทั้งหมด 437 มก./ลิตร ฟอสฟอรัสทั้งหมด 15 มก./ลิตรโพแทสเซียม 280 มก./ลิตร และเหล็ก 0.93 มก./ลิตร เมื่อนำไปใช้ทดลองในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองโดยการใช้เทคนิค Seed inoculum ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ด้วยการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหาร Sweet Potato Dextrse Broth (SPDB) บนเครื่องเขย่า (120 rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ Seed inoculum ร้อยละ 7 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ปรับสภาวะต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือของเหลือง คือค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งเท่ากับ 6 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 และอัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 6:0.5:1:0.06 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 วัน โดยที่การใช้อัตราการเติมอากาศ 0.5 vvm เห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถให้ผลิตเส้นใยแห้ง มีปริมาณสารเอ็นโดโพลิแซคคาไรด์ และเอ็นโดเบต้ากลูแคนสูงสุดเท่ากับ 2.308 กรัม/ลิตร 3,072 และ 37,570 ไมโครกรัม/กรัม นน.เซลล์แห้ง ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 vvm เชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองให้ปริมาณสารเอ็กโซเบต้ากลูแคนสูงสุด 69,512 ไมโครกรัม/กรัม นน.เซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดในรูป endocellular product ซึ่งสกัดได้จาก *Ganoderma calidophilum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีความสามารถสูงในการจับกับอนุมูลของ DPPH และ ABTS ได้ถึงร้อยละ 87.4 และร้อยละ 80.7 ตามลำดับ ให้ปริมาณฟีนอลทั้งหมด 307 ไมโครกรัม/มล. และค่า FRAP 513 ไมโครกรัม/มล. สารสกัดในรูป endocellular product ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าสารสกัดในรูป exocellular product

Abstract

The objective of this research was survey on local medicinal mushroom occurence in Sounthern Thialand. The palm oil mill effluent was applicated for medium broth culture of medicinal mushroom mycelium. The results were found that mycelium growth rat, polysaccharide and ß -glucan analysis of local medicinal mushroom 15 isolates from natural sources in the 3 sourthern provinces of Songkhla, Phatthalung and Satun. *Daldania concentrica* has the highest growth rate with a colony diamerter of 9.0 cm at 7 day of cultivation time. While, the maximum of polysaccharide content (1,230 mg/l) and ß-glucan content (920 mg/l) were obtanted from *Ganoderma calidophilum.* The chemical characteristics of palm oil mill effluent were analysed includining pH 7.93, Chemical Oxygen Demand 7,286 mg/l, Total Dissolve Solid 11,720 mg/l, Total Suspended Solid 1,900 mg/l, Carbohydrate 4.30 mg/l, Total Kjeldahl Nitrogen 437 mg/l, Total Phosphorus 15 mg/l, Total Potassium 280 mg/l and Iron 0.93 mg/l. The initial inoculum of *Ganoderma calidophilum* mycelium was prepared by seed inculum technique. The technique was done by cultivation the mycelium in Sweet Potato Dextrse Broth (SPDB) and placed on a rotay shker (120 rpm) at room temperature for 7 days. The seed inoculum (7 % v/v) was cultivated in palm oil mill effuent by varous conditions. The obtimized condition for *Ganoderma calidophilum* mycelium cultivated in palm oil mill effuent was including initial pH 6, C:N ratio at 40, micronutrients ratio of $CaCl_2$: $MgSO_4$: $ZnCl_2$: $FeSO_4$ at 6.0:0.5:1.0:0.06 and incubated at room temperature for 8 days. It was found that when the areatio rat adjusted at 0.5 vvm, this condition gave maximum value of mycelium dry weight, endopolysacchid and endo ß-glucan contents was 2.3 g/l, 3,072 and 37,570 mg/ dry cell weight, respectively. While, the aeration rat was adjusted at 1.5 vvm, the maximum value of exo ß-glucan content was obtained at 69,512 mg/l. Moreover, the endocellular product was extracted from *Ganoderma calidophilum* mycelium which cultivated in palm oil mill effluent gave exhibited the higest values of DPPH and ABTS at 87.4 % and 80.4%, respectively. The total phenolic value was 307 µg/ml , and FRAP value was 513 µg/ml, respectively. Besides, the endocellular extract showed antimicrobial activity against pathogenic bacteria of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* than those of exocellular extract.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดสมุนไพรพื้นเมืองภาคใต้ในอาหารเหลวจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งได้ทำการวิจัยโดยคณาจารย์และนักศึกษาปริญญาโท สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม และอาจารย์จากคณะวิทยาการจัดการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554-2556 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และ *ß*-1,3-glucan ที่พบในเห็ดพื้นเมืองของภาคใต้ตอนล่าง และเพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล และ *ß*-1,3-glucan อาหารเหลวที่ใช้วัตถุดิบจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม รวมทั้งการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

คณะผู้วิจัยโครงการใคร่ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและพัฒนาที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย และคณะการจัดกาสิ่งแวดล้อมที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาปริญญาโทสาขาการจัดการสิ่งแวดล้อมและอาจารย์จากคณะวิทยาการจัดการที่ร่วมกันทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าส่วนที่เป็นประโยชน์และมีคุณค่าของงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจของชุมชนในพื้นที่ภาคใต้ได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(10)
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	2
1.2.2 ปริมาณ และลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	3
1.2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	5
1.2.4 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดสมุนไพร	8
1.2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด	8
1.2.4.2 องค์ประกอบและสารออกฤทธิ์ที่พบในเห็ดสมุนไพร	9
1.2.4.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพร	13
1.2.5 สารพอลิแซคคาไรด์ และ ß-1,3-glucan	19
1.2.5.1 สารพอลิแซคคาไรด์	19
1.2.5.2 ß-1,3-glucan	21
1.2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	23
1.3 วัตถุประสงค์	24
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	24
1.5 ขอบเขตการวิจัย	24
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	
2.1 วิธีดำเนินการ	25
2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร	25
2.1.2 การวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ ß-1,3-glucan	25
2.1.2.1การทดสอบลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร	25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.2.2 การทดสอบความสามารถของสายพันธุ์เห็ดพื้นเมืองภาคใต้ที่เจริญในอาหารเหลวเอสพีดีบี 25

2.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 27

2.1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 27

2.1.2.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น 28

2.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียม Seed inoculum 28

2.1.2.4 การศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 29

2.1.2.5 การศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 29

2.1.2.6 การศึกษาอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 30

2.1.2.7 การศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 30

2.1.3 ศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 31

2.1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเสร็จแล้ว 31

2.1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 32

2.1.3.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.1.3.4 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 33

2.1.4 การวางแผนการทดลอง 34

2.2 วัสดุ และอุปกรณ์ 35

2.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์ 35

2.2.2 เครื่องมือ 35

2.2.3 สารเคมี 35

บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร 37

3.1.1 ผลการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร 37

3.1.2 ผลการวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ ß-1,3-glucan 42

3.1.2.1 ผลการทดสอบลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสุนไพร 42

3.1.2.2 การทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพรในอาหารเหลวเอสพีดีบี 45

3.2 ผลศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 48

3.2.1 ผลศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.2.2 ผลการเตรียมเชื้อเริ่มต้น 49

3.2.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียม Seed inoculum 50

3.2.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 51

3.2.5 ผลการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 54

3.2.6 ผลการศึกษาอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร 57

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.7 ผลการศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด 61

3.3 ผลศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 65

3.3.1 ผลศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเสร็จแล้ว 65

3.3.2 ผลวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 66

3.3.3 ผลวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 67

3.3.4 ผลศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 73

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง 75

4.1.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร 75

4.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 75

4.1.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม 75

4.2 ข้อเสนอแนะ 76

เอกสารอ้างอิง 77

ภาคผนวก ก วิธีเตรียมสารเคมี และวิธีวิเคราะห์ 88

ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมี และวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ 93

ภาคผนวก ค บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (Proceeding) 101

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	5
2.1	องค์ประกอบทางเคมี และวิธีวิเคราะห์น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	27
2.2	องค์ประกอบทางเคมีและวิธีวิเคราะห์น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในสภาวะที่เหมาะสม	32
2.3	ชนิดของโลหะหนัก และวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม	32
3.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสมุนไพรที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง	38
3.2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	49
3.3	ผลการวิเคราะห์น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด	66
3.4	ความเข้มข้นของโลหะหนักที่พบในสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	67
3.5	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ด	74

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
ภาคผนวกที่		
ก.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	89
ก.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	89
ก.3	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ß-1,3-glucan ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	91
ก.4	ค่า Fluorescence intensity ของสารละลายมาตรฐาน ß-1,3-glucan ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	92
ข.1	การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (Total phenolic contents)	93
ข.2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	94
ข.3	การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (DPPH assay)	95
ข.4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	96
ข.5	การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (ABTS assay)	97
ข.6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับ	98
ข.7	การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (FRAP assay)	99
ข.8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ	100

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	4
1.2	ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา	9
1.3	โครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์	20
1.4	โครงสร้างของ *ß*-1,3-glucan	21
2.1	ลักษณะโหลแก้วที่ใช้ในการทดลอง	28
3.1	ลักษณะการเจริญเส้นใยของเห็ดสมุนไพรเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วัน	43
3.2	การเจริญเติบโตของโคโลนีของเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	43
3.3	ปริมาณสารเอนโดโพลิแซคคาไรด์ของตัวอย่างเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน	46
3.4	ปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ของตัวอย่างเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน	47
3.5	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระยะเวลา Seed inoculum ต่างๆ	52
3.6	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระดับพีเอชเริ่มต้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งและมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	53
3.7	ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระดับพีเอชเริ่มต้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	54
3.8	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	56
3.9	ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	57

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.10	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนแร่ธาตุต่าง ๆ (มิลลิโมลต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	59
3.11	ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนแร่ธาตุต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	60
3.12	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน	62
3.13	ปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์และเอนโดพอลิแซคคาไรด์ ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน	63
3.14	ปริมาณสาร Exo-*ß*-1,3-glucan และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน	65
3.15	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ	69
3.16	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ	70
3.17	ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ	72
3.18	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ	73

รายการรูป (ต่อ)

รูป ภาคผนวกที่		หน้า
ก.1	กราฟมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric	91
ก.2	กราฟมาตรฐาน *ß*-1,3-glucan วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue	93
ข.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid	95
ข.2	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT (DPPH assay)	97
ข.3	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT (ABTS assay)	99
ข.4	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT (FRAP assay)	101

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยมีผลผลิตปาล์มน้ำมันมากเป็นอันดับ 3 ของโลก รองจาก มาเลเซีย อินโดนีเซีย มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 4.077 ล้านไร่ โดยพื้นที่ร้อยละ 87 อยู่ในภาคใต้ และมีโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มประมาณ 80 โรงงาน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคใต้ มีกำลังการผลิตประมาณปีละ 10-12 ล้านตันปาล์มทะลาย (กรมการค้าภายใน, 2555) ประเทศไทยมีแนวโน้มการใช้น้ำมันปาล์มในปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 8.01 ต่อปี ซึ่งสอดคล้องกับแผนพัฒนาอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน และน้ำมันปาล์ม (ปี 2551-2555) ที่ตั้งเป้าการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มให้ได้ ปีละ 500,000 ไร่ เพื่อลดภาวการณ์ขาดแคลนน้ำมันปาล์มภายในประเทศ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2555)

ในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มต้องใช้น้ำเป็นปริมาณมาก ทำให้เกิดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตเป็นปริมาณมากเช่นกัน โดยในการผลิตเพื่อให้ได้น้ำมันปาล์มดิบ 1 ตัน ต้องใช้น้ำถึง 5,000-5,700 ลิตร และมากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำที่ใช้จะกลายเป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพบว่า ในน้ำทิ้งมีปริมาณของสารอินทรีย์สูง ทั้ง โปรตีน ไขมัน สารประกอบไนโตรเจน และแร่ธาตุ (Liew, 2015) จากคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหากไม่มีการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำ และสร้างปัญหามลภาวะทางน้ำเป็นอย่างมาก เช่น ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงส่งผลให้น้ำเกิดการเน่าเสีย และสิ่งมีชีวิตในน้ำไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ เป็นต้น และจากคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดังที่กล่าวมา จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างแพร่หลาย เช่น การนำไปใช้เป็นปุ๋ย การนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ การนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็น ก๊าซชีวภาพ กรดอินทรีย์ เอนไซม์ และสารกำจัดแมลง เป็นต้น (Wu *et al.,* 2007)

โรงงานสกัดน้ำมันปาล์มขนาดใหญ่มักมีแนวทางในการจัดการกับน้ำทิ้งโดยนำไปผลิตเป็นก๊าซชีวภาพ ซึ่งจะต้องใช้เงินลงทุนเพื่อจัดทำระบบหมักก๊าซค่อนข้างสูง ทำให้โรงงานขนาดเล็กที่มีเงินลงทุนน้อยไม่สามารถทำได้ จึงมักปล่อยให้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มไปอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียโดยตรง ทำให้ไม่ก่อให้เกิดประโยชน์กับโรงงาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้เป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือเพื่อผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นวิธีการนำน้ำทิ้งมาใช้ได้โดยตรง และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย ไม่ต้องใช้เงินทุนมากเพื่อทำการเพาะเลี้ยง จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสนับสนุนให้โรงงานขนาดเล็กนำน้ำทิ้งกลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เพื่อลดปริมาณน้ำเสียที่จะปล่อยออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ

ปกติแล้วเห็ดหลินจือจะพบได้น้อยมากตามธรรมชาติ และมีอายุการเก็บเกี่ยวที่ยาวนานกว่าจะตัดดอกมาสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินในอาหารเหลวจึงเป็นวิธีที่ช่วยลดระยะเวลาในการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดหลินจือได้ (Tang and Zhong, 2002)

สารพอลิแซคคาไรด์ในเห็ดหลินจือมีสรรพคุณช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยในการยับยั้งการเจริญ และแพร่กระจายของเนื้องอก ป้องกันการเกิดมะเร็ง ป้องกันและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Liu, 2015) สารพอลิแซคคาไรด์โดยเฉพาะ ß-1,3-glucan จากเห็ดหลินจือจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั่วโลก หน้าที่โดยทั่วไปของ ß-1,3-glucan จะช่วยส่งเสริมหรือเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกระตุ้นการทำงานของ T-cells, B-cells และเซลล์เม็ดเลือดขาว กลูแคนจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารเสริมสุขภาพหรือใช้เป็นยาป้องกัน และยับยั้งโรคร้ายแรงต่างๆ เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer), ยับยั้งการติดเชื้อ (Anti-infective), โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเอดส์(HIV) ด้วย (Wasser, 2002; Daba and Ezeronye, 2003; Silva 2003; Liu and Zhang, 2005) ดังนั้นน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีส่วนประกอบของสารอาหารต่างๆ และลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแหล่งอาหารตามธรรมชาติของเห็ดหลินจือ และในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีสารประกอบฟีนอลิกปะปนอยู่ ทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเจริญในน้ำทิ้ง แต่เห็ดหลินจือสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารได้ การนำน้ำทิ้งมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำน้ำทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งที่เกิดจากอุตสาหกรรมในพื้นที่ อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณของเสียจากการกระบวนการผลิตที่จะปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

การสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การสกัดแบบใช้น้ำ และการสกัดแบบไม่ใช้น้ำ แต่วิธีการสกัดที่สามารถรองรับวัตถุดิบได้ในปริมาณมาก และให้ผลผลิตในรูปของน้ำมันปาล์มดิบที่มีคุณภาพ คือ การสกัดแบบใช้น้ำ หลักการของกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มคือการสกัดน้ำมันจากผลปาล์มโดยใช้ไอน้ำ และเครื่องอัด น้ำมันปาล์มที่ได้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกน้ำมันโดยใช้แรงโน้มถ่วง ดังรูปที่ 1.1 (จินตนา, 2541)

ขั้นตอนในการสกัดน้ำมันปาล์มแบบใช้น้ำเริ่มจากการนำทะลายปาล์มสด (Fresh fruit bunches) เข้าสู่ขั้นตอนการนึ่งปาล์ม (Sterilization) ด้วยไอน้ำโดยใช้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส การนึ่งทะลายปาล์มสดจะเป็นการยับยั้งเอนไซม์ตามธรรมชาติ และทำให้ขั้วผลปาล์มนิ่ม ผลปาล์ม (Fruit) หลุดร่วงออกจากทะลายปาล์ม (Bunches) ได้ง่าย นอกจากนี้ยังช่วยให้เนื้อเยื่อของผลปาล์มยุ่ย ง่ายต่อการสกัดน้ำมัน ทะลายปาล์มที่ผ่านการนึ่งแล้วจะเข้าสู่ขั้นตอน

การแยกผลปาล์มออกจากทะลายปาล์ม (Stripping) โดยเครื่องแยกแบบหมุน จากขั้นตอนนี้จะได้เป็นทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งจะถูกกำจัดออกไป ส่วนผลปาล์มที่ถูกแยกออกจะถูกส่งต่อไปยังขั้นตอนการย่อยผลปาล์ม (Digestion) การย่อยผลปาล์มมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เมล็ดปาล์ม (Nuts) แยกออกจากผลปาล์ม โดยใช้ไอน้ำร้อน 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที หลังจากสิ้นสุดกระบวนการย่อย ผลปาล์มจะถูกนำเข้าสู่ขั้นตอนการบีบอัด (Pressing) จากขั้นตอนนี้จะได้เป็นน้ำมัน (Crude oil) และเส้นใยปาล์ม(Fibre) ที่ปนอยู่กับเมล็ดปาล์มออกมา (Lam *et al*., 2002) ในส่วนของน้ำมันจากขั้นตอนการบีบอัด จะปะปนไปด้วยน้ำ และของแข็งที่ไม่ใช่น้ำมัน (Non oil solid) จะถูกนำเข้าสู่ขั้นตอนการแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงต่อไป น้ำมันจะถูกปล่อยให้ไหลผ่านถังดักทราย (Sand trap tank) และตะแกรงร่อน (Vibrating screen) เพื่อแยกทราย เส้นใยปาล์ม และสิ่งสกปรกออกก่อนจะส่งไปยังถังตกตะกอน (Settling tank) ที่ถังตกตะกอนจะมีไอน้ำร้อนทำให้ถังมีอุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้เกิดการแบ่งชั้นของน้ำ และน้ำมัน โดยส่วนของน้ำมันจะอยู่ชั้นบนสุด ตรงกลางจะเป็นส่วนของตะกอน (Sludge) ที่ผสมอยู่กับน้ำ ชั้นล่างสุดจะเป็นทราย และอนุภาคอื่นๆที่มีน้ำหนักมาก น้ำมันในชั้นบนสุดจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ (Purification) โดยการหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อแยกน้ำ และสิ่งสกปรกออก ส่วนของตะกอนจะถูกส่งไปยังเครื่องแยกตะกอน (Decanter) เพื่อแยกน้ำมันออกจากน้ำ และของแข็งที่ไม่ใช่น้ำมัน ส่วนของเส้นใยที่ผสมอยู่กับเมล็ดปาล์มเรียกว่า Press cake จะถูกส่งไปยังเครื่องแยกเพื่อแยกเส้นใยปาล์มออกจากเมล็ดปาล์ม เมล็ดปาล์มที่ได้จะนำเข้าสู่ขั้นตอนการกำจัดน้ำด้วยเพื่อทำให้เมล็ดปาล์มแห้งแล้วนำไปกะเทาะแยกเอากะลาปาล์ม (Shell) ออกจากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (Kernel) (Amelia *et al*., 2009)

1.2.2 ปริมาณ และลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มต้องใช้น้ำเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ผลิตไอน้ำสำหรับนึ่งปาล์มและทำให้น้ำมันปาล์มบริสุทธิ์ จากการวิเคราะห์พบว่า น้ำมันปาล์มดิบที่ผลิตได้ 1,000 ลิตร จะต้องใช้น้ำ ถึง 5,000-5,700 ลิตร โดยมากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำที่ใช้สุดท้ายจะกลายเป็นน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (Palm Oil Mill Effluent: POME) (Liew, 2015)

โดยน้ำทิ้งจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสกัดน้ำมันซึ่งมาจาก 5 ขั้นตอนหลักคือ (ธนกฤต พรหมทอง, 2552; Wu *et al.,* 2010)

1) จากการนึ่งปาล์ม เป็นน้ำทิ้งจากการอบทะลายปาล์มด้วยไอน้ำน้ำส่วนนี้แม้จะมีน้ำมันอยู่แต่มีสารแขวนลอยต่ำ และไม่มีสภาพเป็นอิมัลชัน จากกระบวนการนี้จะเกิดน้ำทิ้งขึ้นประมาณ 0.9 ตันต่อตันน้ำมันปาล์ม

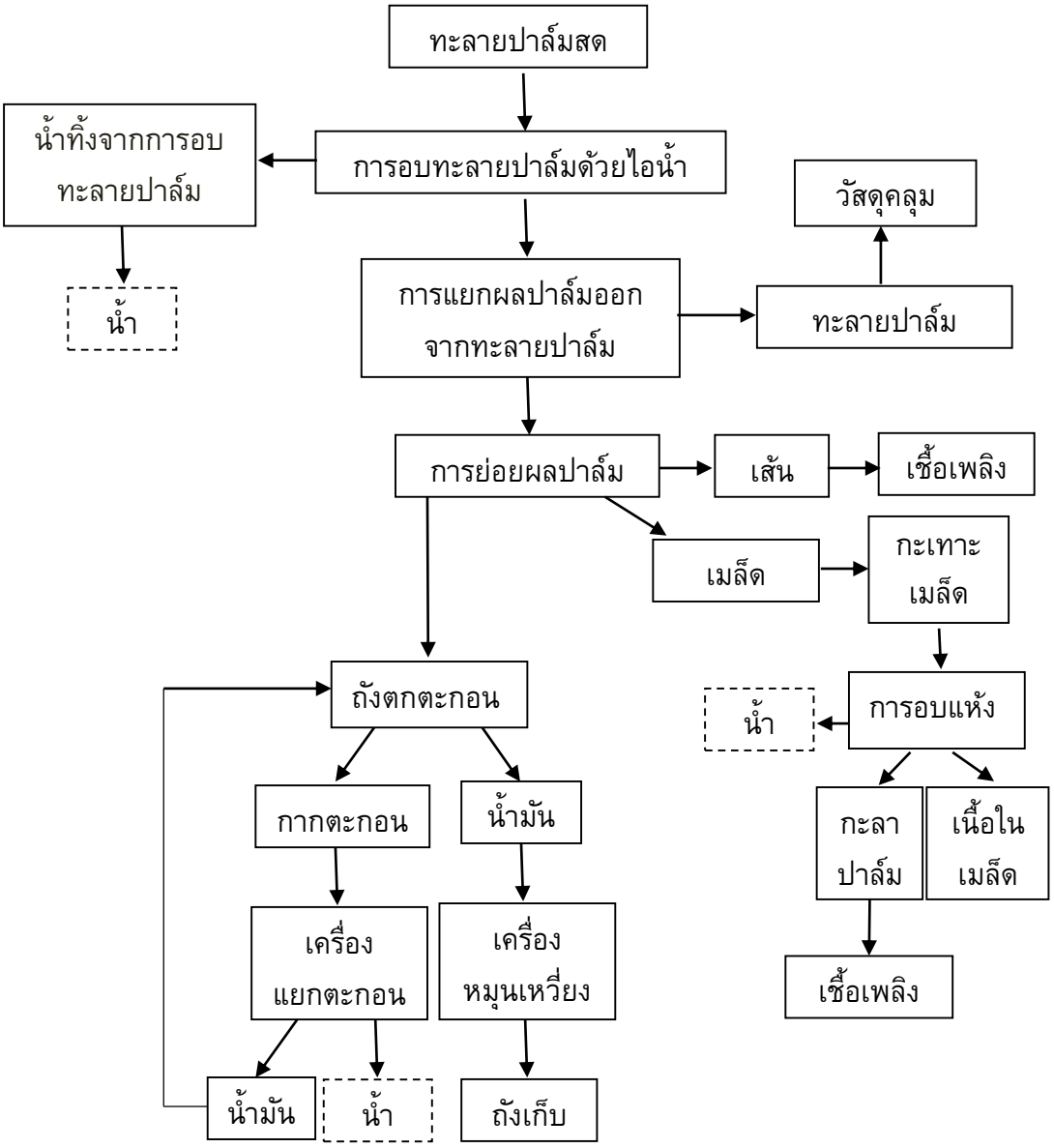
2) จากการขั้นตอนการแยกน้ำ และตะกอนออกจากน้ำมัน น้ำทิ้งส่วนนี้เกิดขึ้นมากที่สุด และเป็นน้ำทิ้งที่มีของแข็งแขวนลอยมาก

3) จากการล้างทำความสะอาดเครื่องมือ ได้แก่ เครื่องแยกกรวดทราย เครื่องแยกน้ำและตะกอนออกจากน้ำมัน และเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง

4) จากการหล่อเย็นหม้อกำเนิดไอน้ำและเครื่องระเหย เป็นน้ำที่มีของแข็งแขวนลอยต่ำมาก และยังสะอาดอยู่ ส่วนใหญ่มีการหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่

5) จากเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง

ลักษณะน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์ม (ตารางที่ 1.1) จะมีสารแขวนลอยปะปนอยู่ร้อยละ 95-56 มีน้ำมันร้อยละ 0.6-0.7 และของแข็งทั้งหมดร้อยละ 4-5 โดยร้อยละ 2-4 จะเป็นของแข็งที่ละลายน้ำได้จากการนึ่งทะลายปาล์ม การแยกตะกอน และเครื่องไฮโดรไซโคลน น้ำทิ้งที่เกิดขึ้นจะมีสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้อยู่สูงมาก ซึ่งน้ำทิ้งนี้สามารถทำให้ออกซิเจนในน้ำลดลงได้และก่อให้เกิดมลพิษอย่างอื่นได้อีกด้วย (Ahmed, 2015)



รูปที่ 1.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Lam และ Lee (2011)

ตารางที่ 1.1 ลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Parameter	Concentration (mg/L)
pH	4.2
Oil and grease	4,000
Biochemical oxygen demand (BOD)	25,000
Chemical oxygen demand (COD	41,000
Total solids	40,000
Suspended solids	18,000
Total volatile solids	34,000
Ammoniacal nitrogen (NH3-N)	35
Total nitrogen (TN)	750
Phosphorous (P)	180
Potassium (K)	2,270
Magnesium (Mg)	615
Calcium (Ca)	439
Boron (B)	7.6
Iron (Fe)	46.5
Manganese (Mn)	2.0
Copper (Cu)	0.89
Zinc (Zn)	2.3

* ยกเว้นค่า pH ที่ไม่มีหน่วยความเข้มข้น

ที่มา : Madaki และ Seng (2013)

นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นมีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารพิษที่สามารถพบได้ในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมสี เป็นต้น ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มอาจพบสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้นสูง (>1000 มิลลิกรัมต่อลิตร) (Alam, *et. al.,* 2009) Zabka และคณะ (2013) พบว่าสารประกอบฟีนอลจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิด โดยจะไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอล

1.2.3 การใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีองค์ประกอบของ ไขมัน สารประกอบไนโตรเจน และแร่ธาตุ

ปริมาณสูง ความสำคัญของการศึกษาคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก็เพื่อนำมาพัฒนาการใช้ประโยชน์จากของเสียโดยใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ และพัฒนากระบวนการจัดการน้ำทิ้งให้มีประสิทธิภาพ การใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงเพื่อนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นการให้ความสำคัญต่อแนวคิดการปลดปล่อยของเสียที่เป็นศูนย์ และการใช้นวัตกรรมที่ก้าวหน้าเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน โดยให้ความสำคัญกับการผลิตก๊าซชีวภาพและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก (Wu *et al.,* 2009)

1) การใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมัก

ความเป็นไปได้ของการนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลมาจากข้อเท็จจริงที่ว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มนั้นมีความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน สารประกอบไนโตรเจน และแร่ธาตุอยู่สูง (Liew, 2015) น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆเช่น ยาปฏิชีวนะ สารกำจัดแมลงชีวภาพ ตัวทำละลาย โพลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอท และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (Wu *et al.,* 2007)

Jamal และคณะ (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มให้ได้เป็นกรด Citric โดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* A103 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ เมื่อใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของสารตั้งต้น น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มร้อยละ 2 แป้งสาลี ร้อยละ 2 กลูโคส ร้อยละ 4 แอมโมเนียมไนเตรท ร้อยละ 0 ระยะเวลาหมัก 5 วัน โดยสามารถให้ผลิตกรด Citric ได้สูงสุด 5.37 กรัมต่อลิตร

Alam และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนรูปน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มให้ได้เป็น Cellulase โดยใช้เชื้อ *Trichoderma harzianum* พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับร้อยละ 2 พีเอชเท่ากับ 4 ใช้หัวเชื้อร้อยละ 3 และความเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ประมาณ 14 Filter Paper Unit/ml

Rasdi และคณะ (2009) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Biohydrogen ที่ใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้นโดยหมักร่วมกับจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่พบในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าสภาวะที่เหมาสมต่อการผลิต คือ ที่พีเอชเท่ากับ 5.75 และความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 272 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อกรัมคาร์โบไฮเดรต และอัตราการผลิตสูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 5.98 และและความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตไฮโดรเจนได้สูงสุด 98 มิลลิลิตรไฮโดรเจนต่อชั่วโมง

2) การนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นปุ๋ย

การประยุกต์ใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นปุ๋ยในดินเป็นความคิดแรกๆที่เกิดขึ้นเพื่อนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มไปใช้ประโยชน์แต่ไม่สามารถทำได้เนื่องจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะทำให้เกิดการอุดตัน ปิดกันการซึมของน้ำ และน้ำขัง นำไปสู่สภาวะไร้ออกซิเจน ทำให้เกิดปัญหากับดิน และพืชได้ จึงใช้วิธีการสร้างระบบสระในแนวระนาบโดยให้มีความกว้างหนึ่งในสามของระยะห่างระหว่างแถวปาล์ม มีความลาดชันเล็กน้อยและตื้น มีน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มตลอดเวลา แทนการใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มรดลงไปโดยตรงบนหน้าดิน เพื่อลดปริมาณพื้นที่ที่เกิดการอุดตันจากอนุภาคขนาดเล็กในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Wood *et al*.,1979)

Agamuthu (1994) ใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นปุ๋ยในการปลูกหญ้า เนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) สามารถให้ผลผลิตสูงถึง 3,276 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมากกว่าการปลูกที่ใช้มูลสัตว์เป็นปุ๋ยที่ได้ผลผลิตเพียง 2,574 กิโลกรัมต่อไร่

Oviasogie และAghimien (2003) ยืนยันว่าการใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในดินจะช่วยปรับปรุงความสมบูรณ์ของดินให้ดีขึ้นในด้านขององค์ประกอบในดิน เช่น ฟอสฟอรัส ไนโตรเจน แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม และโพแทสเซียม และอาจช่วยเพิ่มอินทรียวัตถุในดินในรูปของฮิวมัสที่เกิดหลังจากการย่อยสลาย และกลายเป็นส่วนประกอบของดิน ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีของดิน นอกจากนี้ยังช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตโดยทำให้รากของพืชแข็งแรงด้วยการปรับปรุงโครงสร้างของดินทำให้ได้ผลิต

3) การนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้เป็นอาหารสัตว์

การนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้แทนอาหารสำหรับสุกร สัตว์ปีก และสัตว์เคี้ยวเอื้องกำลังได้รับความนิยม นอกเหนือไปจากใบปาล์ม เส้นใยปาล์ม และกากเนื้อในเมล็ดปาล์มแล้ว น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก็มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการใช้เป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Devendra, 2004)

Hutagalung และคณะ (1977) ศึกษาการใช้น้ำทิ้งโงรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นอาหารสำหรับสุกร สูตรแรกประกอบด้วย ตะกอนน้ำทิ้งร้อยละ 35 กากมันสำปะหลังร้อยละ 34 กากเนื้อในเมล็ดปาล์มร้อยละ 17 และหญ้าป่นร้อยละ 17 สูตรที่สองประกอบด้วย ตะกอนน้ำทิ้งร้อยละ 32 กากมันสำปะหลังร้อยละ 32.5 กากเนื้อในเมล็ดปาล์มร้อยละ 17 หญ้าป่นร้อยละ 17 ซึ่งอาหารทั้งสองสูตรสามารถใช้ทดแทนข้าวโพดได้ร้อยละ 50 ทำให้สามารถประหยัดค่าอาหารสุกรได้ 25 สตางค์ต่อตัวต่อวัน

นอกจากนี้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มยังสามารถใช้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงสัตว์ปีก ในการผลิตอาหารสัตว์สามารถใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแทนข้าวโพดได้ถึงร้อยละ 50 สำหรับอาหารสัตว์ปีก สำหรับอาหารสุกรสามารถใช้ทดแทนข้าวโพดได้ทั้งหมด (Ho, 1976) และยังมีการนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาระเหยแห้งเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์

อีกด้วย โดยระดับที่เหมาะสมในการใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมาระเหยแห้งในอาหารสัตว์ปีกเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตไข่อยู่ที่ร้อยละ 10-15 (Yeong and Azizah, 1987)

1.2.4 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดสมุนไพร

1.2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

1) หมวกของดอกเห็ด จะอยู่ส่วนบนสุดของดอกเห็ด ส่วนใหญ่จะแผ่ขนานราบไปกับพื้นดิน โดยธรรมชาติจะเกิดปีละหน ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม ไม่มีอะไรรบกวน ดอกเห็ดที่โตแล้วก็จะอยู่ในสภาพนั้น และสามารถเจริญได้อีกในปีต่อๆไป เนื้อเห็ดคล้ายจุก ไม้ก๊อก แต่บางทีอาจแข็งเหมือนไม้ ดอกเห็ดในธรรมชาติเมื่อผ่าออกเนื้อดอกจะแบ่งเป็นสองชั้น ชั้นบนจะมีสีเข้มเหมือนเนื้อไม้ ชั้นล่างจะเป็นที่สำหรับสร้างสปอร์จะมีสีอ่อนลง

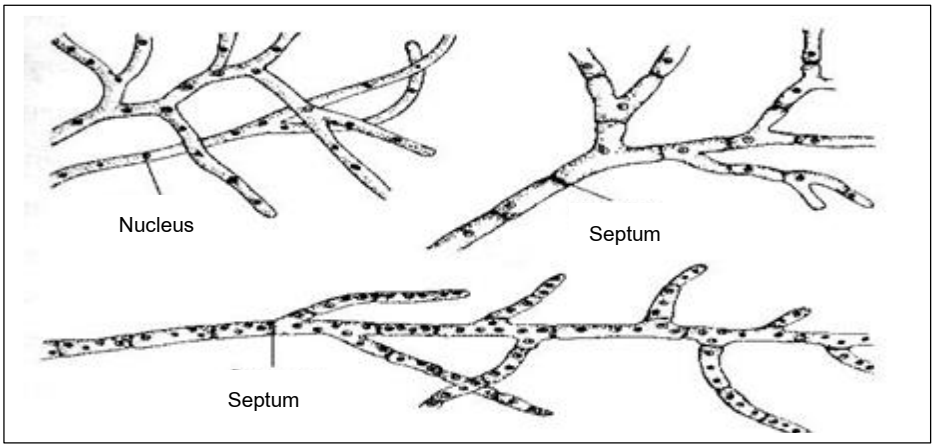
2) รูสำหรับสร้างสปอร์ เป็นรูเล็กใต้หมวก เมื่อดอกเห็ดมีขนาดเล็กอยู่บริเวณนี้จะอัดแน่นติดอยู่ด้วยกัน มีสีแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ขนาดของรูจะมองเห็นได้ชัดเมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะปล่อยสปอร์ออกมา ลักษณะของรูหากใช้กล้องขยายส่องดู จะมีลักษณะเป็นรูกลมเล็กๆ เชื่อมติดกันมี 4-5 รูต่อมิลลิเมตร ภายในรูจะเป็นที่สร้างสปอร์ของดอกเห็ด และจะปล่อยออกมาเมื่อสปอร์แก่เต็มที่ (อานนท์, 2541)

3) สปอร์ โดยทั่วไปมีสีน้ำตาลขนาด 6-8 x 8.5-12.5 ไมโครเมตร ปลายด้านหนึ่งตัดตรง ผิวเรียบ ผนังหนา 2 ชั้น (อานนท์, 2541)

4) ก้านดอก มีหน้าที่ชูส่วนของหมวกให้อยู่สูงเหนือพื้น เป็นทางลำเลียงอาหาร เห็ดหลินจือบางชนิดมีก้านสั้น บางชนิดไม่มีก้าน บางชนิดมีขนาดบางเรียว บางครั้งอาจพบก้านอยู่ตรงกลางดอกแต่ไม่บ่อย แต่โดยทั่วไปจะอยู่เยื้องไปข้างใดข้างหนึ่งหรือติดขอบหมวก (สาธิต, 2539)

5) ฐานก้านดอก เป็นจุดศูนย์รวมของเส้นใยเห็ดที่มารวมกัน เพื่อที่จะสร้างดอก เมื่อมีการพัฒนาจนกระทั่งได้ที่แล้ว จะเกิดเป็นตุ่มเล็กๆขึ้นแล้วชูจากพื้นกลายเป็นก้านชูดอก ลักษณะของฐานเมื่อดอกเห็ดแก่เต็มที่ ส่วนฐานจะบานแผ่เล็กน้อยเพื่อยึดเหนี่ยวส่วนก้านให้แข็งแรงขึ้น (อานนท์, 2541)

6) เส้นใย เกิดจากการเรียงตัวต่อกันของเซลล์หลายๆเซลล์จนเกิดเป็นเส้นใย (Hypha) และเมื่อเส้นใยรวมตัวกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และโพรโทพลาซึม การเจริญของเส้นใยเกิดทางด้านใกล้ปลาย โดยมีการยืดตัวในบริเวณนั้น เส้นใยจะมีการแบ่งตัวเว้าเข้ามาในเซลล์ และเกิดผนังกั้นโดยเยื่อหุ้มเซลล์คอดเข้ามา เกิดเป็นผนังไม่สมบูรณ์เพราะมีรูตรงกลางผนังเพื่อให้โพรโทพลาซึมไหลเวียนถึงกันได้ เส้นใยสามารถแบ่งตามลักษณะผนังกั้นได้ 3 แบบ คือ เส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น เส้นใยแบบมีผนังกั้น และมีนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์ และเส้นใยแบบมีผนังกั้น และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์ (รูปที่ 1.2) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)



รูปที่ 1.2 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา
ที่มา : นงลักษณ์ และปรีชา, 2554

เส้นใยของเห็ดสามารถแบ่งตามการเจริญเติบโตได้เป็น 3 ระยะ (สาธิต, 2539)

6.1) เส้นใยเกิดใหม่ จะมีผนังกั้นเซลล์บางๆ และแขนเชื่อมต่อเซลล์ (Clamp connection) ผนังโปร่งใส แตกกิ่งก้านออกไป เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5-4.5 ไมโครเมตร อายุจะสั้นมาก

6.2) เส้นใยที่แก่ เกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใยที่เกิดใหม่ จะมีสีหม่นๆโปร่งแสง จนมีสีน้ำตาลทอง ไม่มีผนังเซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 ไมโครเมตร จะมีกิ่งกานแยกออกไป แต่ปลายกิ่งก้านจะแคบเข้า ดูเป็นปลายแหลมเหมือนแส้

6.3) เส้นใยที่รวมตัวกัน เป็นเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของดอกเห็ด ตรงจดผนังของรูพวกนี้จะไม่มีสี ผนังเซลล์จะหนา มักจะโค้งงอ มีกิ่งก้าน และเส้นผ่านศูนย์กลางทั่วไปประมาณ 1.5-2 ไมโครเมตร เส้นใยตรงแถบหลังหมวกดอกจะเป็นเซลล์ที่ค่อนข้างหนา ด้านหนาจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25-30 ไมโครเมตร มีผนังหนามาก อีกปลายของเซลล์จะคล้ายแป้งตกตะกอนจับอยู่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-11 ไมโครเมตร ส่วนเส้นใยที่รวมตัวกันเป็นเนื้อที่โคนดอกติดกับก้านดอก จะมีผนังเซลล์หนา ไม่มีผนังกั้นเซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3.5 ไมโครเมตร เส้นใยบางส่วนจะผอมบาง แตกกิ่งก้านเหมือนกิ่งไม้ ผนังเซลล์หนา โปร่งแสง ไม่มีผนังกั้นเซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 ไมโครเมตร

1.2.4.2 องค์ประกอบและสารออกฤทธิ์ที่พบในเห็ดสมุนไพร

องค์ประกอบที่พบในเห็ดหลินจือเป็นสารต่างๆที่มีความสำคัญ และจำเป็นต่อการสร้างองค์ประกอบอื่นที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต โดยในเห็ดหลินจือจะมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 26-28 ไขมันร้อยละ 5 กากใยร้อยละ 59 โปรตีนร้อยละ 7-8 และเถ้าร้อยละ 1.8 (Mau *et. al.,* 2001) สารอนินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Na, Mg,

Mn, Pb, Sn และ Zn และยังมีองค์ประกอบทางอินทรีย์สารที่น่าสนใจ ได้แก่ กรดอินทรีย์ในกลุ่มไตรเทอร์พีนที่สำคัญ คือ กรดกาโนเดอริก กรดลูซิเนดิก และกรดกาโนลูซิดิก และสารประกอบเชิงซ้อนหลายชนิด เช่น ไลโซไซม์ และโปรตีเนส และสารประกอบน้ำตาลเชิงซ้อน เช่น BN_3A, BN_3B, และ BN_3C (ชยันต์, 2541)

ในดอกเห็ดหลินจือมีสารประกอบหลายชนิดที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายมนุษย์ เช่น (1-3)-*ß*-D-glucans ช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอก aminopolysaccharides ช่วยยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง และ Ganoderic acid ช่วยป้องกันเซลล์ตับ เป็นต้น (Silva, 2003) (ตารางที่ 1.3) จึงมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย โดยตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีซึ่งสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในปัจจุบันพบมากกว่า 50 ชนิด และจำแนกได้ดังนี้ (สุรพล และชวลิต, 2539)

1) สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม (Bitter triterpenoid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่ไขมันแต่มีคุณสมบัติคล้ายไขมัน สารที่มีรสขมส่วนใหญ่จะอยู่ที่ดอก และก้าน

2) พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่อาจเกาะติดกับโปรตีนหรือสารอื่นๆ

3) สเตอรอยด์ (Steroids) มีปริมาณอยู่เพียงเล็กน้อยแต่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

4) กลุ่มสารนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) มีการค้นพบสารอะดีโนไซด์ (Adenosine) ในเห็ดหลินจือ และยังพบสารอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติคล้ายอินเตอร์เฟียรอน (Interferon- like substance)

5) สารประกอบเยอร์มาเนียม (Germanium) เยอร์มาเนียมเป็นธาตุแข็งพบในโสมทั่วไป ในกระเทียม และพบมากในเห็ดหลินจือ

ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่กล่าวถึงข้างต้นสามารถพบได้ในเห็ดสมุนไพรหลายชนิดและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้หลากหลาย เช่น เห็ดหลินจือเป็นเห็ดสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีนและญี่ปุ่นมานานแล้วเพื่อรักษาโรคนานาชนิดรวมทั้งโรคมะเร็ง สารสำคัญที่พบในเห็ดหลินจือ ได้แก่ Steroids, Lactones, Alkaloids, Polysaccharides และ Triterpenes ซึ่งสารที่เกี่ยวกับเภสัชวิทยาที่สำคัญคือสารโพลิแซคคาไรด์ที่ละลายได้ในน้ำ Goa และคณะ(2005)ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำจากเห็ดหลินเจือ (Ganopoly) ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยจำนวน 47 คนโดยให้สาร Ganopoly 54 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าผู้ป่วย 41 คน มีปริมาณ Cluster determinant (CD)3, CD4, CD8 และCD5 เพิ่มขึ้น และในน้ำเหลืองพบว่ามี Interleukin (IL)-2, IL-6 และ Interferon (IFN)-γ, Natural killer cells (NK) เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ส่วนปริมาณของ IL-1 และ Tumor necrosis factor (TNF) จะลดลงจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า Ganopoly มีผลต่อการช่วยเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immunomudolating) ซึ่งภูมิคุ้มกันนี้จะช่วยให้ร่างกายสามารถยับยั้งการ

เจริญของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ในเห็ดหลินจือยังมีสาร Triterpens ไม่ต่ำกว่า 100 ชนิด เป็นสารที่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ จัดอยู่ในกลุ่มของ Lanostane-type tripenoids เช่น Ganoderic, Ganodernic, Lucidenic และ Ganolucidic acid และสารดังกล่าวได้มีการพิสูจน์แล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงในการรวมตัวกับออกซิเจน ซึ่งคุณสมบัติเด่นของสาร Triterpens เหล่านี้คือป้องกันและรักษาโรคความดันโลหิตสูง (Anti-hypertensive) ได้ดีพอๆกันกับคุณสมบัติในการป้องกันและยับยั้งการเป็นโรคภูมิแพ้ (Anti-allergic)

เห็ดแครงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Schizophyllum commune Fr. มีชื่อท้องถิ่นหลากหลายชื่อด้วยกันเช่น เห็ดตีนตุ๊กแก เห็ดจิก เห็ดยาง(ภาคใต้) เห็ดแก้น เห็ดตามอม (ภาคเหนือ) และเห็ดมะม่วง(ภาคกลาง) เห็ดแครงเป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ทั่วโลกและมีตลอดปี พบขึ้นอยู่บนวัสดุหลากหลายชนิดเช่น ท่อนไม้ กิ่งไม้ และใบไม้ผุ ในภาคใต้พบมากบนท่อนไม้ยางพารา ในเห็ดแครง 100 กรัมจะมีธาตุเหล็กสูงถึงประมาณ 280 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 646 มิลลิกรัม แคลเซียม 90 มิลลิกรัม ไขมันร้อยละ 0.5 และโปรตีนร้อยละ 17 (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546) นอกจากนี้ยังพบว่าเห็ดแครงมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดเช่น ซีสตีน (Cystine) กลูตามีน(Glutamine) และยังมีสารโพลิแซคคาไรด์ที่สำคัญได้แก่กลูแคนที่ชื่อว่า Schizophyllan เป็นจำนวนมาก (Manzi and Pizzoferrato, 2000; Kidd, 2000; Suwanno,2007, Sletmoen, et al., 2009) (Halpern and Miller, 2002; Wasser, 2002; Babitskaya, et al., 2003; Dada and Ezeronye, 2003; Goa, et al., 2005; Liu and Zhang, 2005; Yang and Zhang, 2009)

ปกติแล้วเห็ดสมุนไพรพบได้น้อยในธรรมชาติและบางครั้งอาจมีการปนเปื้อนจากสารเคมีหรือจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ นอกจากนั้นเห็ดสมุนไพรยังมีอายุการเก็บเกี่ยวนานกว่าที่จะตัดดอกมาสกัดเอาสารออกฤทธิ์ทางยา แต่เนื่องจากความต้องการสารสกัดจากเห็ดสมุนไพรมีสูง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อลดระยะเวลาในการผลิตและควบคุมการปนเปื้อนจากสารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ Wagner และคณะ (2003) ได้อธิบายถึงเทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือว่าส่วนใหญ่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged culture) เพื่อผลิตสาร Polysaccharides และ Ganoderic acid โดยควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อมที่จำเป็นต่อการเจริญเช่นอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้และค่าพีเอชของสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาแหล่งอาหารอื่นเพื่อเพิ่มปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์แทนสูตรอาหารสังเคราะห์เดิมที่ใช้อยู่ Babitskaya และคณะ (2003) ศึกษาวิธีการผลิต Biomass, Endo และ Exo-polysaccharides จากเห็ดหลินจือในสูตรอาหารที่มีปริมาณแหล่งสารคาร์บอนที่ระดับต่างๆพบว่า Endo และ Exo-polysaccharides ที่ผลิตจากเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Beer wort มีระดับเพิ่มมากขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหาร Glucose-peptone ส่วนLactose, Starch, Cellulose, Glucose และ Xylose จัดเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับการผลิต Biomass และ Eno-polysaccharides

Xiao และคณะ (2004) ศึกษาสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมในการผลิตเส้นใยและสารโพลิแซคคา-ไรด์จากเห็ด Cordycep pruinusa พบว่า สูตรอาหารจะประกอบไปด้วย potato starch ร้อยละ 2, sucroseร้อยละ 2.5, soybean ร้อยละ 0.5, beef extract ร้อยละ0.5, yeast extract ร้อยละ 1, KCl ร้อยละ0.02, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.1 และ $MgSO_4 . 7 H_2O$ ร้อยละ0.05 โดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว 50 มิลลิลิตรและใส่เม็ดลูกปัด (bead) จำนวน 15 เม็ดเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายตัวของเซลล์ และการละลายได้ของออกซิเจน โดยทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าได้ปริมาณมวลเซลล์ และสารโพลิแซคคาไรด์ เท่ากับ 31.5 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Kim และ คณะ (2005) ทดลองผลิตชีวมวลและสาร Exo-polysaccharides จากเห็ด Agrocybe cylindracea ในอาหารเหลวพบว่าองค์ประกอบสารอาหารที่เหมาะต่อการผลิตเส้นใยประกอบด้วย Maltose 80 กรัมต่อลิตร, Martone A-1 6 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 .7H_2O$ 1.4 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2$ 1.1 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 แต่องค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต Exo-polysaccharides ประกอบด้วย Maltose 60 กรัมต่อลิตร, Martone A-1 6 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 .7H_2O$ 0.9 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2$ 1.1 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะได้มวลเซลล์สูงสุด 11.64 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 9 วัน ส่วนปริมาณ Exo-polysaccharides สูงสุดเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 10วัน แต่เมื่อทดลองขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร กลับพบว่าองค์ประกอบของสารอาหารที่เหมาะสม ประกอบด้วย glucose 20 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.46 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 .7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร, meat peptone 2 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 จะได้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุด 9.06 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณสาร Exo-polysaccharides สูงสุด 1.24 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 9 วัน

Cho และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและ Exo-polysaccharides จากเห็ด Tremella Funciformis ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย glucose 20 กรัมต่อลิตร, tryptone 2 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.46 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 .7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 ปรับความเร็วของการหมุนใบพัดที่ 200 รอบต่อนาที ให้อากาศที่ 2 vvm และควบคุมอุณหภูมิของน้ำหมักที่ 28 องศาเซลเซียส จะได้มวลเซลล์ของเห็ด Tremella Funciformis เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร และปริมาณ Exo-polysaccharides เท่ากับ 2.28 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน

Amano และคณะ (2007) ศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือและการผลิตสาร ß-1,3-glucan ในอาหารเหลวที่สภาวะการเลี้ยงแบบนิ่ง (static culture)

ในอาหาร MYS พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเส้นใยเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส เลี้ยงในสภาวะมืดจะได้ปริมาณมวลเซลล์สูงสุด 5.8 กรัมต่อลิตร และปริมาณ □-1,3-glucan ทั้งหมดทั้งที่สกัดด้วยน้ำร้อนและสารละลายด่างเท่ากับ 0.2 กรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

Pokhrel และ Ohga (2007) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเส้นใยและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ด Lyophyyllum decastes สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตเส้นใยได้สูงสุดคือ น้ำตาลแลคโตส กลูโคส และ ฟรุคโตส โดยให้ปริมาณมวลเซลล์เท่ากับ 6.73, 6.36 และ 6.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ทั้งชนิดที่ผลิตอยู่นอกเซลล์ และชนิดที่ผลิตอยู่ในเซลล์ พบว่าน้ำตาลกลูโคสให้ประสิทธิภาพสูงสุด เท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรและ 317 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนพบว่า ยีสต์สกัดให้ประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการผลิตมวลเซลล์และโพลิแซคคาไรด์ชนิดที่ผลิตอยู่ในเซลล์ให้ผลผลิตเท่ากับ 7.03 กรัมต่อลิตร และ 325 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพีเอชของสารอาหารเริ่มต้นที่ 7 และ 8 ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ทั้งชนิดที่ผลิตอยู่นอกเซลล์และชนิดที่ผลิตอยู่ในเซลล์ ปริมาณมวลเซลล์ที่ได้ เท่ากับ 1.73 กรัมต่อลิตร 320 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 7.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ 10 วัน บนเครื่องเขย่า 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Hao และคณะ (2010) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสาร Exo-polysaccharides จากเห็ดแครง (Schizophyllum commune) พบว่าองค์ประกอบของสารอาหารที่สำคัญและมีผลต่อการการเจริญของเส้นใยและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้แก่ Sodium carboxymethycellulas, L-glutamic acid, vitamin B1, naphthalene acetic acid, oleic acid และTween 80 เมื่อใช้สารอาหารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้ปริมาณเส้นใยเห็ด 25.93 กรัมต่อลิตร และได้สาร Exo-polysaccharides 2.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

1.2.4.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพร

เห็ดสมุนไพรที่พบในธรรมชาตินั้นโอกาสที่จะพบเห็ดในสภาพสมบูรณ์เหมาะกับการใช้ทำเป็นยาค่อนข้างน้อย เนื่องจากมักจะปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อมที่เห็ดอาศัยอยู่ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น (สาธิต, 2539) ซึ่งในปัจจุบันทั่วโลกได้มีการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรโดยใช้วิธีการดังต่อไปนี้ เช่น การเพาะบนท่อนไม้ การเพาะในขวดหรือถุงพลาสติก และการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เป็นต้น (Perumal *et al.,* 2009)

1) การเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือบนท่อนไม้

ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา มีการศึกษาจำนวนมากที่พยายามหาวิธีที่ดีที่สุดที่จะทำให้เห็ดมีคุณภาพมากขึ้น ซึ่งวิธีที่ดีที่สุดที่จะได้เห็ดหลินจือคุณภาพดีคือการเพาะเลี้ยงบนท่อนไม้ แต่การเพาะเลี้ยงบนท่อนไม้มีข้อจำกัดจากความหลากหลายของชนิดไม้ที่ไม่แน่นอน

และท่อนไม้บางท่อนต้องแปรรูปก่อน และท่อนไม้ยังมีราคาแพงอีกด้วย นอกจากนี้ยังต้องการระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 5-12 เดือน ถึงจะเก็บดอกเห็ดได้ (Perumal *et al.,* 2009) เช่น การเพาะเลี้ยงเห็ดหอม เห็ดหลินจือ และเห็ดแครง เป็นต้น

ตัวอย่างเช่นการเพาะเห็ดหลินจือบนท่อนไม้นิยมทำกันในประเทศจีน และญี่ปุ่น ไม้ที่นิยมนำมาเพาะเห็ดหลินจือเป็นไม้จำพวกไม้เนื้อแข็งที่มีใบกว้าง เช่น ตันเชอรี่ป่า ไม้ที่เหมาะสมควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8-15 เซนติเมตร โดยตัดให้มีความยาวประมาณ 1-1.5 เมตร ทำการเจาะรูให้ระยะห่างระหว่างรูประมาณ 8-10 เซนติเมตร และระหว่างแถวห่าง 6-8 เซนติเมตร ใส่เชื้อที่เตรียมไว้ในรูปิดขี้ผึ้งหรือจุกพลาสติก ต่อจากนั้นจึงนำท่อนไม้เหล่านี้กองไว้ในที่ร่มลมไม่โกรกประมาณ 1 เดือน เพื่อให้เส้นใยเจริญเข้าไปในเนื้อไม้ ท่อนไม้ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญเต็มแล้วอาจนำเข้าโรงเรือนแล้วรดน้ำได้เลย จนกระทั่งเห็ดออกดอกเหมือนกับการเพาะเห็ดชนิดอื่นๆบนต้นไม้ หรืออาจนำท่อนไม้ไปฝังดิน เป็นวิธีการที่นิยมในประเทศจีน วิธีการคือ ขุดหลุมกว้างประมาณ 4-5 เมตร ลึกประมาณ 2-3 นิ้ว จากนั้นวางท่อนไม้ลงไปห่างกันประมาณ 1 นิ้ว จากนั้นกลบด้วยดินหนาประมาณ 1 นิ้ว หลังจากกลบดินแล้วจึงทำซุ้มสูงประมาณ 1 เมตร คลุมด้วยพลาสติก พ่นน้ำวันละ 1-2 ครั้งให้ดินชื้นอยู่เสมอ รอจนกระทั่งมีเห็ดเจริญขึ้นเหนือดิน (วสันณ์, 2536)

2) การเพาะเลี้ยงเห็ดในขวดหรือถุงพลาสติก

การเพาะเลี้ยงเห็ดในขวดหรือถุงพลาสติก มี 3 ขั้นตอนได้แก่ การผลิตเชื้อในอาหารแข็ง การผลิตเชื้อขยายจากเมล็ดธัญพืช และการผลิตเชื้อเพาะ (ก้อนเชื้อ) (ลือชา และคณะ, 2553) ดังต่อไปนี้

2.1) การผลิตเชื้อในอาหารแข็ง เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโดยการแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือเพาะเลี้ยงสปอร์ดอกเห็ดในอาหารแข็ง เชื้อเห็ดจะเจริญออกมาสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว การผลิตเชื้อในอาหารแข็งเป็นงานเริ่มต้น และสำคัญมากของการเพาะเลี้ยงเห็ด เป็นขั้นตอนที่อาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยา ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ การเตรียมอาหารแข็ง การเตรียมดอกเห็ด และการแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง

2.2) การผลิตเชื้อขยายจากเมล็ดธัญพืช เชื้อเห็ดถือว่าเป็นหัวใจที่สำคัญที่สุดในการเพาะเลี้ยงเห็ด เพราะถ้าหากเชื้อเห็ดมีคุณภาพไม่ดี ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยง อายุเชื้อเห็ด เป็นต้น แม้ว่าจะมีวิธีการเพาะเลี้ยงดีอย่างไร ก็ไม่สามารถทำให้ได้รับผลผลิตสูงได้ ดังนั้นสิ่งที่ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษในการผลิตเชื้อเห็ดคือ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ การผลิตเชื้อขยายเป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องจากการผลิตเชื้อในอาหารแข็ง และเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ให้มีมากขึ้น โดยการนำเส้นใยของเชื้อเห็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งมาขยายเลี้ยงในเมล็ดธัญพืชที่ได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้เชื้อเห็ดที่พร้อมจะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม

เมล็ดธัญพืชที่สามารถนำมาใช้ผลิตเชื้อขยายเห็ดมีหลายชนิด เช่น ข้างฟาง ข้าวโพด ข้าวเปลือก เป็นต้น

2.3) การผลิตก้อนเชื้อเห็ด ใช้วัสดุที่เป็นเศษพืชมาเพาะ โดยนำมาใส่ขวดหรือถุงพลาสติกอัดให้เป็นก้อน ซึ่งเห็ดเกือบทุกชนิดสามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกเห็ดได้จากก้อนเชื้อที่ได้จากขี้เลื่อย

Veena และ Pandey (2011) ศึกษาการนำฟางข้าวมาใช้เป็นวัสดุเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ โดยทดลองนำฟางข้าวผสมกับขี้เลื่อยร้อยละ 0,22.5,45 และ 67.5 และรำร้อยละ 10 จากการทดลอง สูตรอาหารในแต่ละสูตรจะให้ผลไม่ต่างกันทั้งด้านระยะเวลาการผลิตดอกเห็ด ความชื้น ผลผลิตและลักษณะดอกเห็ด โดยสูตรที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือที่อัตราส่วนของ ขี้เลื่อย: ฟางข้าว:รำ เท่ากับ 22.5:67.5:10 โดยมีค่า Biological efficiency (BE) เท่ากับ ร้อยละ 29.9 รองลงมาคือที่อัตราส่วนของ ขี้เลื่อย:ฟางข้าว:รำ เท่ากับ 45:45:10 โดยมีค่า Biological efficiency (BE) เท่ากับร้อยละ 27.3

3) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ข้อได้เปรียบของการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวคือ เส้นใยที่ผลิตได้จะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า เพียงระยะเวลา2-3 สัปดาห์ ก็สามารถนำเส้นใยที่ผลิตได้มาสกัดกรดกาโนเดอริก และสารพอลิแซคคาไรด์ได้ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 3-5 เดือนในการผลิตดอกเห็ด (Tang and Zhong, 2002) และสารพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเส้นใยจะมีประสิทธิภาพมากกว่าที่ผลิตได้จากดอกเห็ด (Lee *et a*l., 2007) แต่ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้นั้นในปริมาณน้ำหนักตัวอย่างที่เท่ากันการสกัดจากส่วนดอกเห็ดจะได้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ได้จากเส้นใย (Heleno *et al*., 2012) ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือในอาหารเหลวมี 2 ขั้นตอนคือ การเลี้ยงบนอาหารแข็งและการเลี้ยงในอาหารเหลว การเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นการเก็บรักษาเชื้อโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารพีดีเอที่มีส่วนผสมของ Malt extract ร้อยละ 1 Yeast extract ร้อยละ 4 D-glucose ร้อยละ 0.4 และ Agar ร้อยละ 2 เลี้ยงในตู้บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็งครบ 7 วัน มาตัดเป็น 5 ชิ้น ขนาดชิ้นละประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร แล้วใส่ลงในอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส (Berovic *et al*., 2003)

ในการเลือกใช้ชนิดของอาหารในการเพาะเลี้ยงนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยสูตรอาหารที่ใช้มันเทศ (Sweet potato) แทนอาหารสำเร็จรูปพีดีเอ (Potato dextrose agar)เชื้อราที่เพาะเลี้ยงจะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีกว่า (Amadi and Moneke, 2012) ซึ่งในมันเทศนั้นมีส่วนประกอบของน้ำตาลหลายชนิด เช่น ซูโครส กลูโคลส ฟรักโตส และมอลโตส (Chapman and Horvat, 1989) และจากการดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราของ Aoki และ

Jongjeen (2009) โดยใช้อาหารสูตรมันเทศผสมมันสำปะหลังในอัตราส่วน 1:1 พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกับอาหารมันฝรั่ง

Lee และคณะ (2002) ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือโดยใช้หางเนยเป็นอาหารเพาะเลี้ยงพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อาหารมีพีเอชเท่ากับ 4.2 และอุณหภูมิ 28.3 องศาเซลเซียส จะให้สารพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ 1.2 กรัมต่อลิตร

4) ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

4.1) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็นค่าที่บอกความยากง่ายในการย่อยสลาย อาหารที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมากจะมีอัตราการย่อยสลายต่ำ เนื่องจากความไม่สมดุลของปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายสารอินทรีย์ เพื่อนำคาร์บอนไปเป็นแหล่งพลังงาน และนำไนโตรเจนไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน (Sharma *et al.,* 1997) Yuan และคณะ (2012) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร 100 มิลลิลตร เลี้ยงในที่มืด บนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้เอกโซพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ 1.723 กรัมต่อลิตร เมื่ออาหารที่ใช้มีส่วนประกอบของ กลูโคลส 70 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10 ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 เท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ $MgSO_4$ เท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร และสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เส้นใยเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 7.235 กรัมต่อลิตร เมื่ออาหารที่ใช้มีส่วนประกอบของ กลูโคลส 50 กรัมต่อลิตร อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 25 ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 เท่ากับ 1.5 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ $MgSO_4$ เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร

4.2) การกวน และการเติมอากาศ อัตราการกวนที่เหมาะสมจะแสดงถึงสมดุลระหว่างการถ่ายโอนออกซิเจนลงในอาหาร และความเค้นเฉือน (Shear stress) เมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนและความเค้นเฉือนก็จะเพิ่มขึ้นด้วย จากการทดลองของ Yang และ Liu (1998) โดยใช้อัตราการกวนที่ 50-250 รอบต่อนาทีกับขวดรูปชมพู่ พบว่า ความหนาแน่นของชีวมวลสูงสุดเมื่อความเร็วการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที แต่ปริมาณเอกโซพอลิแซคคาไรด์ จะสูงสุดเมื่อความเร็วการกวนเท่ากับ 150 รอบต่อนาที แสดงให้เห็นว่าการเขย่าที่ความเร็วสูงจะสนับสนุนให้เกิดผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ เนื่องจากเป็นการลดการดูดซับเอกโซพอลิแซคคาไรด์ ที่ถูกหลั่งออกมาบนผนังเซลล์ ทำให้ไปกระตุ้นการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น แม้จะใช้อัตราการเขย่าที่คงที่ตลอดการหมักแต่ความหนืดอาจเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของชีวมวล และเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้ต้องมีการเพิ่มความเร็วในการกวน

นอกจากนี้ Fang และ Zhong (2002) ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำได้พบว่า การผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ Dissolved oxygen tension

(DOT) เท่ากับร้อยละ 10 จะสูงกว่าที่ DOT เท่ากับร้อยละ 25 และปริมาณของ เอนโดพอลิแซคคาไรด์ และกรดกาโนเดอกริกในชีวมวลก็สูงกว่าด้วยที่ DOT เท่ากับร้อยละ 10

4.3) พีเอชเริ่มต้น การทดลองมักไม่ได้มีการควบคุมพีเอชตลอดเวลา ส่วนใหญ่เป็นการควบคุมพีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารต่างๆ จากการศึกษาของ Fang และ Zhong (2002) พบว่า หลังจากวันที่สี่ค่าโปรไฟล์ของพีเอชจะได้เหมือนกันแม้ว่าจะใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างกันตั้งแต่ 3.5-7.0 โดยในช่วงสี่วันแรกค่าพีเอชจะลดลงเป็น 3.2 และคงที่อยู่เป็นเวลาหนึ่งอาทิตย์ หลังจากนั้น ประมาณวันที่ 10-14 เมื่อกลูโคสใกล้จะหมด เซลล์จึงไม่สามารถผลิตชีวมวล และกรดกาโนเดอริกต่อไปได้ ทำให้ค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 7 ในวันท้ายๆของการเพาะเลี้ยง ผลผลิตของชีวมวลจะได้สูงสุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยจะได้ชีวมวล 17.3 กรัมต่อลิตรโดยน้ำหนักแห้ง ผลผลิตของกรดกาโนเดอริก ได้สูงสุดเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 โดยจะได้กรดกาโนเดอริก 1.2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และเอกโซพอลิแซคคาไรด์ จะได้ผลผลิตสูงสุดในช่วงของค่าพีเอช 5.5-7.0 และ 3.5-4.5 ตามลำดับ

4.4) ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น การลดลงของอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของเห็ดหลินจือจะลดลงตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 35 กรัมต่อลิตรและทำให้ความดันออสโมติกในอาหารเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตจะมีประสิทธิภาพน้อยเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นยังมีผลต่อขนาดของ Pellet ด้วย ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการกระจายขนาด Pellet ที่เลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 8 วันพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Pellet จะเล็กกว่า 1.2 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 50 และ 65 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Pellet จะใหญ่กว่า 1.6 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (Fang and Zhong, 2002)

4.5) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือมีตั้งแต่ 25-35 องศาเซลเซียส โดยที่ใช้มากที่สุดจะอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ในการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ และอัตราเจริญเติบโตของเส้นใย อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (Fang and Zhong, 2002) ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะได้ผลผลิตของเอกโซพอลิแซคคาไรด์สูง ส่วนการผลิต เอนโดพอลิแซคคาไรด์ต้องการอุณหภูมิระดับต่ำ 10-15 องศาเซลเซียส (Lee *et al*., 2007)

4.6) ความหนาแน่นของเชื้อเริ่มต้น ความหนาแน่นของเชื้อมีผลต่อกระบวนการหมัก และความหนาแน่นของชีวมวลสุดท้าย โดยที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 70-670 มิลลิกรัมต่อลิตร จะอยู่ในระยะแล็กเฟส 1 วัน ในขณะที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะอยู่ในระยะแล็กเฟส 4 วัน ในส่วนของความหนาแน่นของชีวมวลสุดท้ายจะเพิ่มขึ้นจาก 13.6 กรัมต่อลิตรที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 15.7 กรัมต่อลิตรที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะลดลงเหลือ 14.2 กรัม

ต่อลิตรที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 670 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ความหนาแน่นของเชื้อยังมีผลต่อการกระจายขนาดของ Pellet โดยในวันที่ 8 ของการหมัก ที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 670 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละ 68.3 ของขนาด Pellet จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 1.2 มิลลิเมตร และที่ความหนาแน่นของเชื้อเท่ากับ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละ 91.0 ของขนาด Pellet จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 1.6 มิลลิเมตร ผลของความหนาแน่นเชื้อต่อการกระจายขนาดของ Pellet จะส่งผลต่อการสร้างผลผลิต ปริมาณเอนโดพอลิแซคคาไรด์จะสูงกว่าใน Pellet ขนาดเล็ก ในขณะที่ปริมาณของกรดกาโนเดอริกจะสูงกว่าใน Pellet ขนาดใหญ่ ซึ่งปริมาณกรดกาโนเดอริกในชีวมวลจะสูงขึ้นเมื่อความหนาแน่นของเชื้อเป็น 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ความหนาแน่นนี้จะทำให้เกิด Pellet ขนาดใหญ่ แม้ว่าปริมาณของกรดกาโนเดอริกในชีวมวลจะสูงขึ้น แต่ผลผลิตรวมของกรดกาโนเดอริก จะดีกว่าเมื่อความหนาแน่นของเชื้อเป็น 170 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากมีความหนาแน่นของชีวมวลสูงขึ้น (Fang *et al*., 1999)

4.7) สารยับยั้งการเกิดฟอง ในการเพาะเลี้ยงเห็ดด้วยอาหารเหลวอาจเกิดฟองขึ้นได้จากการหมักของอาหาร โดยฟองที่เกิดขึ้นอาจรบกวนการควบคุมสภาวะของการหมักและอาจทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ยากขึ้น บางครั้งจึงต้องมีการใช้สารต้านการเกิดฟอง น้ำมันพืชหลายชนิดสามารถใช้เป็นสารต้านการเกิดฟองได้ และอาจเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเห็ดอีกด้วย ผลจากการใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันข้าวโพด น้ำมันทานตะวันและน้ำมันมะกอก ใส่ลงในอาหารเหลวประมาณ ร้อยละ 1 พบว่า น้ำมันมะกอกช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตทำให้ได้ความหนาแน่นของชีวมวลสูงสุด ในทางกลับกันน้ำมันดอกคำฝอยทำให้ได้ปริมาณเอกโซพอลิแซคคาไรด์สูงสุด ข้อดีของการใช้น้ำมันจากพืชเป็นสารต้านการเกิดฟองคือมีต้นทุนต่ำและยังช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตอีกด้วย อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบของน้ำมันพืชจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดและการปลูก ความแตกต่างเล็กน้อยด้านองค์ประกอบของกรดไขมันอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของชีวมวลระหว่างการหมักได้ โดยผลของกรดโอเลอิก ทำให้ได้ความหนาแน่นชีวมวลสูงสุด ตามมาด้วยกรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก ในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะกระตุ้นการผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ด้วยการเติมกรดปาล์มิติกตามด้วยกรดโอเลอิก และกรดสเตียริก ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าร้อยละ 0.1 ลงไป กรดลิโนเลอิก จะยับยั้งการผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์ เช่นเดียวกับกรดสเตียริก ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 ผลการตอบสนองต่อกรดไขมันอาจแตกต่างกันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด (Fang and Zhong, 2002; Yang *et al*., 2000)

4.8) สัณฐานวิทยาของเห็ด กระบวนการเมตาบอลิซึมของเห็ดมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเอง โดยในการเลี้ยงที่มีการเขย่า เห็ดจะเจริญเติบโตในลักษณะเป็นPellet ซึ่งการผลิตสารต่าง ๆจะมีความสัมพันธ์กับขนาดของขนาด Pellet เช่น ผลผลิตของกรดกาโนเดอริก ใน Pellet ที่มีขนาดใหญ่กว่าปกติจะมีผลต่อการแพร่ของออกซิเจน เนื่องจากข้อจำกัดของออกซิเจนในศูนย์กลางของ Pellet จะมีผลต่อการกระตุ้นการผลิตกรดกาโนเดอริกจากเซลล์บริเวณนั้น ในขณะที่ความเข้มข้นของเอนโดพอลิแซคคาไรด์จะมีความเข้มข้น

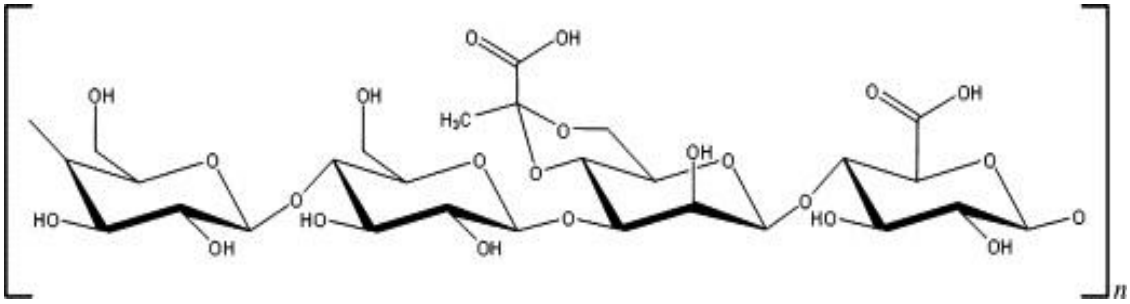
น้อยกว่า Pellet ที่มีขนาดใหญ่ ขนาดของ Pellet เป็นผลมาจากตัวแปรหลายๆอย่างๆ เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร การกวน และความหนาแน่นของเชื้อ (Fang and Zhong, 2002)

4.9) แร่ธาตุ เป็นสารอาหารที่เห็ดต้องการในปริมาณน้อยแต่ขาดไม่ได้ แร่ธาตุจะมีผลต่อการเจริญของเห็ดทำให้เห็ดเจริญได้ตามปกติ โดยเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เห็ดผลิตได้ จากงานวิจัยของ Cui และ Zhang (2011) พบว่าความเข้มข้นของ Zn^{2+} และ Fe^{2+} ที่เติมลงในอาหารมีผลต่อขนาดของ Pellet โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นขนาดของ Pellet จะมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย นอกจากนี้จากรายงานวิจัยของ Kim และคณะ (2005) พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการขยายตัวของผนังเซลล์ และความสามารถในการแทรกซึมของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วน Mg^{2+} เป็นแร่ธาตุที่ทำหน้าที่เป็น Cofactor ในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสมดุลของเยื่อหุ้มเซลล์

1.2.5 สารพอลิแซคคาไรด์ และ *ß*-1,3-glucan

1.2.5.1 สารพอลิแซคคาไรด์

พอลิแซคคาไรด์เป็นโพลิเมอร์ที่มีสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก เกิดจากโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไปจนถึง 1,000 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (รูปที่ 1.3) พอลิแซคคาไรด์ในธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่มีสี ไม่มีรส เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายคอลลอยด์ พอลิแซคคาไรด์เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ไกลแคน (Glycan) หมายถึง สายแซคคาไรด์ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของโมโนแซคคาไรด์ที่มาประกอบ ความยาวของสาย ชนิดของพันธะที่ใช้เชื่อม และระดับของกิ่งก้านสาขา ประเภทของพอลิแซคคาไรด์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้าง คือ โฮโมพอลิแซคคาไรด์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน ได้แก่ แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส เดกซ์แทรน เป็นต้น และเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ที่มากกว่าหรือเท่ากับสองชนิดมาเชื่อมต่อกันได้แก่ เพกติน อินูลิน กัม และวุ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังแบ่งพอลิแซคคาไรด์ได้เป็น 2 กลุ่มตามหน้าที่ได้แก่ พอลิแซคคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน (Storage polysaccharide) เช่น แป้ง และไกลโคเจน และพอลิแซคคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช และเปลือกภายนอกของสัตว์ (Structural polysaccharide) เช่น เซลลูโลส และไคติน (ศุภศิษฏ์, 2552)



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์
ที่มา : Urai และคณะ (2006)

สารที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือส่วนมากจะอยู่ในรูปของสารพอลิแซคคาไรด์ และไตรเทอร์พีน ปริมาณของสารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากดอกเห็ดหลินจือจะมีประมาณ ร้อยละ 0.82 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (Zhang and Lin, 2004) โดยสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดจะมีคุณสมบัติโดยตรงที่สามารถป้องกันสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็ง ยับยั้งการกระจายของเนื้องอก และป้องกันระบบภูมิคุ้มกัน (Silva, 2003) จากผลการทดลองของ Ikekawa (2001) พบว่า จากการทดลองในหนูชุดแรกที่ฉีดสารก่อมะเร็งให้หนู 36 ตัว ซึ่งเป็นชุดควบคุม หลัง 76 สัปดาห์ หนู 21 จาก 36 ตัว เกิดเนื้องอก การทดลองชุดที่สองฉีดสารก่อมะเร็งให้หนู 36 ตัว และเลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของสารพอลิแซคคาไรด์ ร้อยละ 5 หลัง 76 สัปดาห์ มีหนูเพียง 3 จาก 36 ตัว เท่านั้นที่เกิดเนื้องอก

Gao และคณะ (2003) คัดเลือกผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตามอวัยวะต่างๆ 134 คน ให้ทานอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของเห็ดหลินจือปริมาณ 1,800 มิลลิกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ร้อยละ 80 ของผู้ป่วยจะมีการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันของเซลล์ โดยมีปริมาณและกิจกรรมของ IL-2, IL-6 IFN-Y และ NK cell เพิ่มขึ้น และทดลองในผู้ป่วยมะเร็งปอด 68 คน ให้ทานอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของเห็ดหลินจือปริมาณ 1,800 มิลลิกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับอาหารเสริมมีจำนวนของ NK cell และ T-cell เพิ่มขึ้น

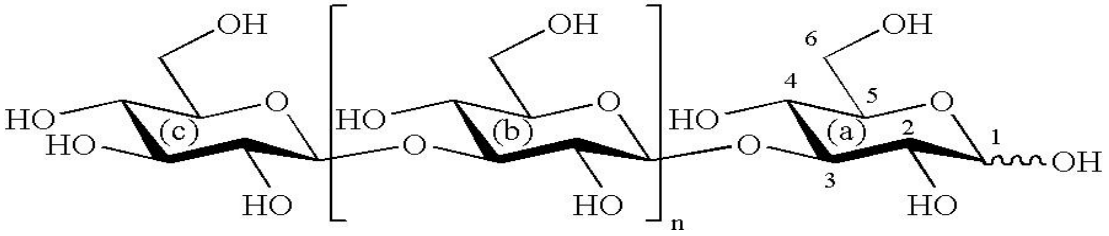
พอลิแซคคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (Primary product) ที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Wang *et al*., 2015) พอลิแซคคาไรด์หลายชนิดสามารถผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในอาหารเหลว (Kim *et al*., 2005) ส่วนใหญ่ที่ได้จากเส้นใยเป็นเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และเอกโซพอลิแซคคาไรด์ (Cheung, 1996) เอนโดพอลิแซคคาไรด์เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์ เป็นสารสำคัญที่ทำให้เซลล์อยู่รอดโดยสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนแก่เซลล์ได้ ต้องอาศัยการสกัด และการทำบริสุทธิ์เพื่อนำเอาออกมาจากเซลล์ (Hippe, 1991)

ส่วนเอกโซพอลิแซคคาไรด์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ใน 2 รูปแบบคือ แคปซูลซึ่งยึดติดอยู่กับผนังเซลล์ และในรูปของเมือกซึ่ง

ปลดปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมรอบๆเซลล์ เอกโซพอลิแซคคาไรด์มีหลากหลาย และมีลักษณะเฉพาะที่ไม่ซ้ำกัน มักมีความซับซ้อนทางโครงสร้างเคมี ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากสารต้านจุลินทรีย์ และทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Kumon, 1994)

1.2.5.2 ß-1,3-glucan

สารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดส่วนมากจะอยู่ในรูปของกลูแคน (Glucan) (Wasser, 2002) กลูแคนเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ผนังเซลล์ของพืช แบคทีเรีย ราและเห็ด โดยกลูแคนสามารถจำแนกได้ตามชนิดของสายพันธะที่เชื่อมต่อโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสด้วยพันธะ α หรือ ß ในธรรมชาติ ß-glucan เป็นโครงสร้างที่พบมาก มีโครงสร้างคือโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß โดยที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 1 ของน้ำตาลกลูโคสตัวแรกจะเชื่อมต่อกับคาร์บอนตัวที่ 3 ของน้ำตาลกลูโคสตัวที่สองได้เป็น ß-1,3-glucan ดังรูปที่ 1.5 และหากโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 4 หรือ 6 ก็จะได้ ß-1,4-glucan หรือ ß-1,6-glucan จากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าโครงสร้างน้ำตาลที่พบมากในเห็ดโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลชนิด ß-1,3-glucan (Manzi and Pizzoferrato, 2000; Suwanno, 2007)



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ ß-1,3-glucan
ที่มา : Mursito และคณะ (2010)

หน้าที่โดยทั่วไปของ ß-1,3-glucan จะเกี่ยวกับสุขภาพ โดยกลูแคนจะช่วยส่งเสริมหรือเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกระตุ้นการทำงานของ T-cells, B-cells และเซลล์เม็ดเลือดขาว ส่งผลให้ร่างกายสามารถต้านทานหรือป้องกันเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น ดังนั้นกลูแคนจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารเสริมสุขภาพหรือใช้เป็นยาป้องกัน และยับยั้งโรคร้ายแรงต่างๆ เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer), ยับยั้งการติดเชื้อ (Anti-infect), โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเอดส์ (HIV) และมีงานวิจัยอีกหลายฉบับยืนยันว่า ß-1,3-glucan ยังช่วยเสริมและเพิ่มความสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย (Daba and Ezeronye, 2003; Liu and Zhang, 2005; Silva 2003; Wasser, 2002) และยังพบว่า ß-1,3-glucan ที่ได้จากเชื้อรานั้นจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเนื้องอกสูงกว่า ß-1,3-glucan ที่ได้จากแหล่งอื่น (Bohn and Bemiller, 1995)

1.) ผลของ ß-glucan ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ß-glucan จากเห็ดราบางชนิดจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจากผลกระทบที่เป็นอันตรายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมและสารก่อมะเร็ง มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ ß-glucan เองได้ แต่สารเหล่านี้ระบบภูมิคุ้มกันของเรายอมรับแม้ไม่ได้สร้างจากร่างกายเอง รวมทั้งชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดและภูมิคุ้มกันจำเพาะ (Brown and Gordon, 2005) ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด ภูมิคุ้มกันแต่กำเนิดมีอยู่ตั้งแต่เราเกิดและเป็นภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ มีการตอบสนองต่อโครงสร้างของแอนติเจนหลายชนิด ß-glucan บางชนิดกระตุ้นการทำงานของ ฟาโกไซต์ โดยชักนำให้เกิดการกำจัดเชื้อโรคด้วยกระบวนการฟาโกไซโตซิส (Munz *et al.,* 2005)

2.) ß-glucan กับการรักษาโรคมะเร็ง แม้ว่าการรักษาโรคมะเร็งด้วยการผ่าตัด การใช้เคมีบำบัด และการบำบัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันจะมีประสิทธิภาพ แต่จากการศึกษาไกกลการเกิดมะเร็งพบว่าการรักษาด้วยการไม่ผ่าตัดมีประสิทธิภาพมากกว่า ß-glucan จากเห็ดราบางชนิดมีอิทธิพลต่อการเกิดและการพัฒนาของมะเร็ง เช่นข้อมูลที่ได้จากการทดลองในหนู พบว่า หนูที่ได้รับ ß-glucan จะมีขนาดของมะเร็งเล็กลงกว่าหนูกลุ่มควบคุม (Vetvicka and Yvin 2004) นอกจากนี้ ß-glucan อาจช่วยสร้างความต้านทานต่อผู้ป่วยที่รักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัดและการฉายรังสี เช่น ลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้นของผู้ป่วยที่เป็น leukoponia (Harada *et al*., 2002)

3.) ß-glucan กับการรักษาโรคติดเชื้อ ปัญหาหลักของการควบคุมโรคติดเชื้อคือความต้านทานของจุลิทรีย์ต่อยาปฏิชีวนะ ß-glucan จากเห็ดราบางชนิดมีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคเกือบทั้งหมด โดยมีผลต่อกลไกของการปรับภูมิคุ้มกัน จากการทดลองของ Vetvicka และ Yvin (2004) ทดลองฉีดเชื้อไวรัสตับอักเสบในหนู พบว่า ß-glucan จะช่วยให้เซลล์ที่ติดเชื้อเหลือรอดมากขึ้นโดยไปยับยั้งการตายของเซลล์ และกระตุ้นการทำงานของฟาโกไซต์

4.) ß-glucan กับการรักษาโรคเบาหวาน ß-glucan จากเห็ดราหลายชนิดอาจลดระดับความเข้มของน้ำตาลในเลือดหลังการรับประทานอาหารได้ โดยทำให้การบีบตัวของกระเพาะอาหารเพื่อดันอาหารลงสู่ลำไส้เล็กช้าลง ดังนั้นน้ำตาลจะค่อยๆถูกดูดซึม (Lo *et al*., 2006) เช่นในการทดลองในหนูที่มีรหัสพันธุกรรมของโรคเบาหวาน โดยให้อาหารที่มีส่วนผสมของเห็ดร้อยละ 20 พบว่ามีการป้องกันการเพิ่มของระดับกลูโคสในเลือดด้วยการเพิ่มความไวของอินซูลิน (Mayell, 2001)

5.) ß-glucan กับการรักษาบาดแผล ß-glucan จะไปกระตุ้นการทำงานของแมกโครฟาจ์ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการรักษาแผล และลดแผลเป็นหลังการผ่าตัดหรือการบาดเจ็บ (Mayell, 2001)

1.2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Free radicals) สารอนุมูลอิสระซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ ความผิดปกติของระบบประสาท โรคเบาหวาน โรคไขข้อ และโรคมะเร็ง เป็นต้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะขัดขวางการทำงานของอนุมูลอิสระด้วยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อของร่างกาย หรือช่วยในการทำลายอนุมูลอิสระ โดยจะปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระที่เป็นสารอันตรายลดความอันตรายลงจนเซลล์ในร่างกายสามารถกำจัดออกไปเองได้ (Halliwell, 2009) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้มีหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Vichitphan *et al.,* 2007)

สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่ได้จากธรรมชาติมากมายหลายชนิด สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ทั้งจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช ซึ่งอาจอยู่ในรูปของเอนไซม์บางชนิดหรือสารอื่นๆ เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น Butylated hydroxyl toluene (BHT), Butylated hydroxyl anisole (BHA) และ Gallic acid เป็นต้น (Sarma *et al.,* 2010)

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อสำรวจ คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์และวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ของสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรที่พบในเห็ดพื้นเมืองของภาคใต้ตอนล่างโดยเน้นจังหวัดสงขลา พัทลุง ตรัง สตูล และจังหวัดใกล้เคียง

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan

1.3.3 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ในเชิงพาณิชย์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สายพันธุ์สมุนไพรในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดสงขลา พัทลุง สตูล และตรัง

1.4.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ในรูปของ *ß*-1,3-glucan จากเห็ดหลินจือที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

1.4.3 เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำของเสียที่เกิดจากการสกัดน้ำมันปาล์มมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรเพื่อผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ในเชิงพาณิชย์

1.4.4 เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และลดการปลดปล่อยน้ำทิ้งออกสู่สิ่งแวดล้อม

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 แยกเชื้อเห็ดสมุนไพรที่เก็บได้จากเขตจังหวัดทางภาคใต้ตอนล่างได้แก่ สงขลา พัทลุง สตูล และตรัง ให้อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์

1.5.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ การเตรียมเชื้อเริ่มต้น ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้ง อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน อัตราส่วนแร่ธาตุ และอัตราการเติมอากาศ

1.5.3 ศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ได้แก่ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการ

2.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร

การเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรโดยการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างดอกเห็ดจากธรรมชาติที่อยู่ในบริเวณป่าที่สามารถเข้าถึงได้ในเขตจังหวัดทางภาคใต้ตอนล่างได้แก่ สงขลา พัทลุง สตูล และตรัง ในช่วงต้นฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 การเก็บจะเลือกเก็บดอกเห็ดที่มีลักษณะสมบูรณ์ เพื่อนำมาแยกเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Stamets (2000) โดยนำดอกเห็ดฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดให้เป็นชิ้นเล็กๆ วางบนอาหารแข็งพีดีเอ (Potato Dextrose Agar: PDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญแล้วทำการเขี่ยเชื้อบนอาหารชนิดเดียวกันซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บตัวอย่างในอาหารแข็งเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อไว้ใช้ต่อไป

2.1.2 การวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์และ *ß*-1,3-glucan

2.1.2.1 การทดสอบลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร

โดยนำเชื้อเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งพีดีเอจากข้อ 2.1.1 ตัดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นวุ้นวางลงบนอาหารแข็งพีดีเอ (จานเพาะเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่เพิ่มขึ้นทุกๆวัน จนเส้นใยเจริญเต็มจานอาหาร

2.1.2.2 การทดสอบความสามารถของสายพันธุ์เห็ดพื้นเมืองภาคใต้ที่เจริญในอาหารเหลวเอสพีดีบี

โดยนำเชื้อเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งพีดีเอจากข้อ 2.1.1.1 ตัดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี (Sweet Potato Dextrose Broth: SPDB) ที่ประกอบด้วย มันเทศ 250 กรัม กลูโคส 20 กรัม เพปโทน 1 กรัม วิตามินบีหก 0.5 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร (สุวิทย์ และไชนะ, 2555) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (Static condition) และมืด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มฟลาสก์ หลังจากนั้นกรองเส้นใยด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3 ครั้ง เส้นใยที่ได้ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-ß-1,3-glucan

1) การสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์

นำตัวอย่างเส้นใยเห็ดที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วมาสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ตามวิธีของ Suwanno และคณะ (2005) โดยนำเส้นใยเห็ดที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้ว 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 120 นาที แล้วนำไปเติม Silicon dioxide 2 กรัม บดด้วยโกร่งจนละเอียด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายใสส่วนที่ 1 ส่วนของตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ได้สารละลายใสส่วนที่ 2 ส่วนของตะกอนที่เหลือนำไปเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ได้สารละลายใสส่วนที่ 3 ส่วนของตะกอนนำมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ได้สารละลายใสส่วนที่ 4 นำสารละลายใสทั้ง 4 ส่วนที่ได้มารวมกัน

2) การวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์

สารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenols Sulfuric Colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dubois และคณะ (1956) ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ นำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ5 (ละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3) การวิเคราะห์ปริมาณ Endo-ß-1,3-glucan

สารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue ดัดแปลงจาก Suwanno และคณะ (2005) โดยใช้ ß-1,3-D-glucan เป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำตัวอยางที่ได้จากการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ 400 ไมโครลิตร ผสมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 800 ไมโครลิตร และผสมกับสีย้อม (Aniline blue) 4.8 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น Excitation 393 นาโนเมตร และ Emission 479 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าตามสมการที่ 1

$$\text{Fluorescence intensity} = \text{Total fluorescence} - \text{Auto fluorescence} \quad (1)$$

ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรนี้จะคัดเลือกมาใช้เพียง 1 สายพันธุ์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดี และให้ผลผลิตเป็นสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-ß-1,3-glucan ในปริมาณสูงสุด เพื่อนำไปพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อไป

2.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

2.1.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในเขตอำเภอละงู จังหวัดสตูล ที่เก็บจากตอนกลางของระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบ Facultative pond โดยเก็บจากบ่อที่ 3 ของระบบบำบัด ซึ่งมีทั้งหมด 6 บ่อ เนื่องจากปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในบ่อแรกนั้น มีปริมาณสูงมากจนไม่สามารถนำน้ำทิ้งมาใช้ได้โดยตรง จึงเก็บตัวอย่างจากบ่อบำบัดที่ 3 เพื่อลดการใช้น้ำสะอาดมาผสมกับน้ำทิ้งเพื่อเจือจางความเข้มข้นของน้ำทิ้งก่อนนำไปใช้ ในการเก็บตัวอย่างใช้วิธีเก็บแบบจ้วง (Grab sampling) น้ำทิ้งที่เก็บได้ใส่ในภาชนะพลาสติกแล้วปิดฝาให้สนิท หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดเศษใบไม้และกิ่งไม้ออก หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีของ A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005) ดังตารางที่ 2.1

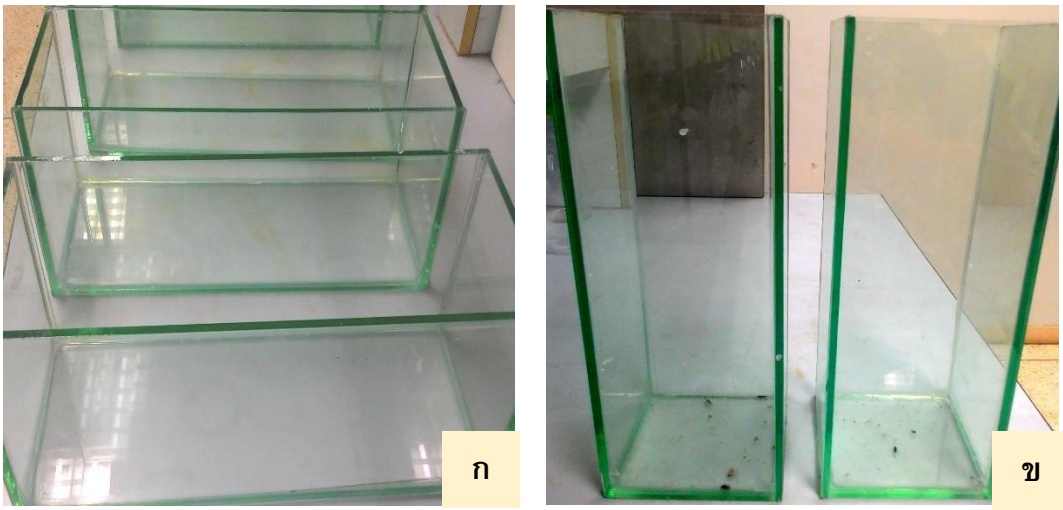
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีและวิธีวิเคราะห์น้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบทางเคมี	วิธีวิเคราะห์
Chemical Oxygen Demand	Closed reflux, titrimetric method
Total Solids	Total solids dried at 103-105 ^{o}C
Carbohydrate	Phenols sulfuric acid method
Total Kjeldahl Nitrogen	Titrimetric method, Macro-Kjeldahl method
Total Phosphorus	Persulfate digestion method, Ascorbic acid method
Total Potassium	Atomic Absorption Spectroscopy
Iron	Atomic Absorption Spectroscopy
Phenols	Total Phenolic contents (Folin ciocalteu method)
C:N ratio	CHNS-O Analyzer

ที่มา : A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005)

2.1.2.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ใช้เชื้อเห็ดหลินจือที่คัดเลือกจากข้อ 2.1.1 เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยวิธี Disk inoculum โดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดสมุนไพรบนอาหารแข็งพีดีเอเป็นเวลา 7 วัน แล้วตัดเส้นใยเห็ดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้นนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 15 นิ้ว x 5 นิ้ว (รูปที่ 2.1 ก) เลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน แล้วจึงเก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดด้วยการกรองกับผ้าขาวบาง 1 ชั้น และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำเส้นใยที่ได้ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้งต่อไป



รูปที่ 2.1 ลักษณะโหลแก้วที่ใช้ในการทดลอง (ก) โหลแก้วแนวนอนสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบนิ่ง (ข) โหลแก้วแนวตั้งสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเติมอากาศ

2.1.2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียม Seed inoculum

ใช้วิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 2.1.2.2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบีเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน อัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 9 วัน กรองด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้งที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป เพื่อคัดเลือกระยะเวลาที่เชื้อเริ่มต้นสามารถผลิตน้ำหนักเส้นใยแห้งได้สูงสุด

หมายเหตุ ในขั้นตอนการทดลองหลังจากนี้ ผู้วิจัยจะเลือกใช้การเตรียมเชื้อเริ่มต้นแบบ Seed inoculum ตามระยะเวลาที่เหมาะที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1.2.3 แต่มีการปรับเปลี่ยนวิธีการ

นำไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้การเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่งแทนการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้เขย่าในการทดลองมีไม่เพียงพอ

2.1.2.4 การศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร

ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.2.3 ในอัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 15 นิ้ว x 5 นิ้ว (รูปที่ 2.1 ก) โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยกรดซัลฟิวริก (ความเข้มข้น 10 โมลาร์ โดยผสมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 28 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร) ให้เท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 7.93 (ชุดควบคุม) เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 16 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ตามวิธีในข้อ 2.1.1.2 เพื่อคัดเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นที่เห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

2.1.2.5 การศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร

ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.2.3 ในอัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร และสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1.2.4 เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 15 นิ้ว x 5 (รูปที่ 2.1 ก) นิ้ว โดยปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของน้ำทิ้งดรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเท่ากับ 20, 40, 60 และ 80 ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยใช้ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เป็นแหล่งไนโตรเจน คำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนตามวิธีของ Techobanoglous และคณะ (1993) โดยวิธีการคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนกรณีที่น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเท่ากับ 1 ลิตร (สมมุติให้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 40 ต่อ 1)

สมมุติว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมี C อยู่ ร้อยละ 21 และ N ร้อยละ 1 ซูโครสมี C อยู่ ร้อยละ 42 และ N ร้อยละ 0 ถ้าใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 1 ลิตร จะต้องใช้ซูโครส X กรัม ดังนั้น

$[C_{ซูโครส}+C_{น้ำทิ้ง}]÷[N_{ซูโครส}+N_{น้ำทิ้ง}]$ = 40÷1

[42(x) + 21]÷[0 + 1] = 40÷1

42x + 21 = 40

42x = 40-21

x = 19÷42

x = 0.45

ดังนั้นเมื่อต้องการอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นเท่ากับ 40 ต่อ 1 จะต้องใช้น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 1 ลิตร และซูโครส 0.45 กรัม

เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 16 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์และ Endo-*ß*-1,3-glucan ตามวิธีในข้อ 2.1.1.2 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

2.1.2.6 การศึกษาอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร

ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.2.3 ในอัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร และสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1.2.5 เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 15 นิ้ว x 5 นิ้ว (รูปที่ 2.1 ก) โดยในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะเติมแร่ธาตุอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งปรับความเข้มข้นของแร่ธาตุให้ได้ในอัตราส่วน $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03 และ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 16 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์และ Endo-*ß*-1,3-glucan ตามวิธีในข้อ 2.1.1.2 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนแร่ธาตุที่เห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

2.1.2.7 การศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสมุนไพร

ใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.2.3 ในอัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร และสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1.2.6 เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 5 นิ้ว x 15 (รูปที่ 2.1 ข) ปรับอัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที (สมมุติที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ในการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหารน้ำทิ้ง 1 ลิตร การเติมอากาศจะต้องเติมให้ได้ปริมาตรอากาศ 0.5 ลิตร ภายในระยะเวลา 1 นาที) เพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นระยะเวลา 8 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยออกจากอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยผ้าขาวบาง 1 ชั้น

1) ส่วนที่เป็นเส้นใยเห็ด นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง วิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ตามวิธีในข้อ 2.1.1.2 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนการเติมอากาศที่เห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

2) ส่วนที่เป็นอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม นำมาสกัดสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ ดัดแปลงจากวิธีของ Tang and Zhong (2003) และ Lee และคณะ (2007) ดังต่อไปนี้ นำตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอล (ร้อยละ 95 ปริมาตรต่อปริมาตร) 400 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บส่วนที่เป็น Supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ และ Exo-*ß*-1,3-glucan ตามวิธีในข้อ 2.1.1.2 เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนการเติมอากาศที่เห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดี ให้ปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ และ Exo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

2.1.3 ศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

2.1.3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเสร็จแล้ว

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในสภาวะที่เหมาะสม โดยนำน้ำทิ้งที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำเส้นใยเห็ดออกแล้ว มาวิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและวิธีวิเคราะห์น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในสภาวะที่เหมาะสม

องค์ประกอบทางเคมี	วิธีวิเคราะห์
Chemical Oxygen Demand	Closed reflux, titrimetric method
Total Kjeldahl Nitrogen	Titrimetric method, Macro-Kjeldahl method
Total Phosphorus	Persulfate digestion method, Ascorbic acid method
Total Potassium	Atomic Absorption Spectroscopy
Iron	Atomic Absorption Spectroscopy
Phenols	Total Phenolic contents (Folin ciocalteu method)

ที่มา : A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005)

2.1.3.2 วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

วิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเส้นใยของเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม ตามวิธีของ A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005) ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของโลหะหนัก และวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเส้นใยของเห็ดที่เพาะเลี้ยงน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

ชนิดของโลหะหนัก	วิธีวิเคราะห์
Iron	Atomic Absorption Spectroscopy
Copper	Atomic Absorption Spectroscopy
Cadmium	Atomic Absorption Spectroscopy

ที่มา : A.O.A.C (2005) และ APHA, AWWA, WEF (2005)

2.1.3.3 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

1) การสกัดสารสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีสกัดตามวิธีของ Elmastas และคณะ (2007) ดังนี้ นำเส้นใยเห็ดที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส 10 กรัม ปั่นให้ละเอียดผสมกับเมทานอล 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านกระดาษ Whatman เบอร์ 4 กากหลังการกรองนำมาเติมเมทานอลเขย่าและกรอง

อีกครั้ง นำสารสกัดที่กรองได้ทั้งสองส่วนมารวมกันแล้วนำไประเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (Rotary evaporator) เก็บสารที่ได้ไว้ในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่อไป

2) การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยนำสารที่สกัดได้ละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100, 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ 4 วิธี ดังต่อไปนี้

2.1) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic contents) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ 100 ไมโครลิตร เติมโซเดียมคาร์บอเนต 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติม Folin-ciocalteau 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.2) วิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH assay) ตามวิธีของ Elmastas และคณะ (2007) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ 3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.3) วิธี 2, 2'- Azino - bis (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulfonic acid) cation radical scavenging assay (ABTS assay) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009) โดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.4) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009) โดยนำสารละลาย FRAP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 8 นาที ปิเปตมา 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร เติมตัวอย่างที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

2.1.3.4 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

นำผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเส้นใยของเห็ดสมุนไพรเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion (Bauer *et al*., 1996) มีขั้นตอนดังนี้

1) การเตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) และ *Escherichia coli* (ATCC 25923) (เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการก่อโรคต่ำ และได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

1.1) เขี่ยเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) และ *Escherichia coli* (ATCC 25923) ลงบนอาหารแข็ง (Nutrient agar: NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.2) นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.1) มาประมาณ 2-3 โคโลนี ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว (Nutrient broth: NB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

1.3) นำเชื้อจากข้อ 1.2) มาเจือจางด้วยอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้น 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) โดยปิเปตเชื้อมา 1 มิลลิลิตร เติมอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป 2-3 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 5

1.4) ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อจากข้อ 1.3) จากนั้นทำการ Swab ลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง Muller-Hinton agar (MHA) ให้ทั่ว ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

2) การทดสอบตัวอย่าง

นำกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร วางลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.4) แล้วหยดตัวอย่างลงบนแผ่นกระดาษกรอง 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (Inhibition zone) (Bauer *et al*., 1996)

2.1.4 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ทุกชุดการทดลองมีการทำ 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยและเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA: Analysis of Variance) เปรียบเทียบผลความแตกต่างทางสถิติของแต่ละคู่ชุดการทดลองด้วยวิธี LSD (Least Significant Difference) และ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.2 วัสดุ และอุปกรณ์

2.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1) น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2) เห็ดสมุนไพร (จากการเก็บตัวอย่างในธรรมชาติ)
3) ขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ
4) Petri dish
5) กระดาษกรอง เบอร์ 1, 4, 42 และ GF/C (Whatman)
6) ผ้าขาวบาง (pore size ≈ 500 micron)
7) Flask และ Beaker
8) Pipette
9) Test tube
10) Cylinder

2.2.2 เครื่องมือ

1) Water bath (Meemmert W 760)
2) Desiccator (Sanplate 0070)
3) Drying oven (Contherm)
4) Analytical balance (Ohaus EOD 120)
5) pH meter (Russel 150 Labmate)
6) Spectrophotometer (Shimadzu UV-1601)
7) Distillation and digestion apparatus (Gerhardt)
8) Incubator (Memmert BM 700)
9) Shaker (Hedolph promax 2020)
10) HPLC (Agilent 1100)
11) Potary evaporator (Buchi R215)
12) Laminar air flow
13) Automatic pipette (Denville XL 3000i)

2.2.3 สารเคมี

1) Sodium hydroxide (Merck : Analytical)
2) Sodium chloride (Merck : Analytical)
3) Agar (Difco)
4) D-glucose (Ajax Finechem : Analytical)
5) PDA (Himedia : for in vitro diagnostics)

6) Dextrose (Himedia : for in vitro diagnostics)

7) Sodium hydrogen carbonate (Ajax Finechem : Analytical)

8) Sodium thiosulfate (Merck : Analytical)

9) Ammonium sulfate (Ajax Finechem : Analytical)

10) Potassium iodide (Ajax Finechem : Analytical)

11) Potassium persulfate (Ajax Finechem : Analytical)

12) Copper sulfate (Ajax Finechem : Analytical)

13) Sulfuric acid (Merck : Analytical)

14) Boric acid (Ajax Finechem : Analytical)

15) Potassium dichromate (Ajax Finechem : Analytical)

16) Mercuric sulfate (Rankem : Analytical)

17) Magnesium sulphate (Ajax Finechem : Analytical)

18) Nitric acid (Merck : Analytical)

19) Sodium hydrogen carbonate (Merck : Analytical)

20) Acetic acid (Sigma-Aldrich)

21) 2,2'-Azino-bis- (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfunic acid) (Fluka)

22) 2,6-Di-tert-butly-4-methlphenpl (Fluka)

23) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazine (Aldrich)

24) Ferric chloride (Merck : Analytical)

25) Folin-Ciocalteau reagent (Merck : Analytical)

26) Gallic acid (Sigma-Aldrich)

27) Methanol และ Ethanol (J.T. Baker)

28) 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (Fluka)

บทที่ 3
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร

การทดลองในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรที่พบได้ในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนล่างได้แก่ สงขลา พัทลุง สตูล และตรัง ที่ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ และ *ß*-1,3-glucan สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.1.1 ผลการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร

จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างเห็ดสมุนไพรในแหล่งธรรมชาติพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย จังหวัด สงขลา พัทลุง ตรัง และสตูล พบเห็ดสมุน 16 ชนิด สามารถแบ่งลักษณะเห็ดออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเห็ดหิ้งหรือ เห็ดหมื่นรู ได้แก่ เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดหลินจือหนู เห็ดหลินจือกะละแมดำ เห็ดหลินจือสีดำ เห็ดหลินจือน้ำตาลแดงดำ เห็ดหิ้งขาวเทา เห็ดหิ้งน้ำตาลเหลือง เห็ดหิ้งสีส้ม เห็ดหิ้งกรวย เห็ดหิ้งพัดแพรวา กลุ่มเห็ดขี้รังนก ได้แก่ เห็ดถ้วย เห็ดดันหมีม่วงดำ เห็ดตะปู หรือ เห็ดดรรชนีนางไม้ กลุ่มเห็ดปะการัง ได้แก่ เห็ดปะการังหนามสีเทา กลุ่มเห็ดหิ้งครีบเห็ดขอนขาว และ กลุ่มเห็ดครีบ ได้แก่ เห็ดโคน มีลักษณะการเจริญที่เจริญบนต้นไม้ กิ่งไม้ที่พุพัง และบนพื้นดิน ส่วนใหญ่เป็นเห็ดมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ ดังข้อมูลในตารางที่ 3.1 แต่จากการสำรวจพบว่ามีจำนวนสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรที่รวบรวมได้มีปริมาณน้อย เนื่องจากพื้นที่ที่สามารถเข้าไปเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ส่วนใหญ่มีความสมบูรณ์ของป่าน้อย เช่น สวนยางหรือป่าที่อยู่ใกล้ชุมชน และช่วงระยะเวลาการเก็บรวบรวมตัวอย่างที่อยู่ในช่วงต้นฤดูฝน ซึ่งอาจไม่พบเห็ดหลินจือบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อมีความชื้นสูงหรืออยู่ในช่วงที่มีฝนตกมาเป็นระยะเวลานาน

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสมุนไพรจือที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง

เห็ดสมุนไพร	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 เห็ดหลินจือขอบเหลือง (*Ganoderma calidophilum*)	เก็บตัวอย่างเห็ดจาก อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา	ดอกเห็ดมี ขนาด 3-3.7 เซนติเมตร หมวกดอกมีสีมันวาว สีน้ำตาลแดงถึงสีน้ำตาลเข้ม เนื้อดอกสีน้ำตาลเข้ม กินได้มีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์
 เห็ดหลินจือกาละแมดำ (*Ganoderma dahlia*)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง	ดอกเห็ดมีขนาด 8 x 16 เซนติเมตร ดอกเห็ดเป็นรูปพัดครึ่งวงกลม ผิวหมวกมันวาวสีน้ำตาลดำ ถึงดำ ต้านใต้ของดอกมีสีขาวถึงขาวเทา กินได้ มีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์
 เห็ดหลินจือน้ำตาลแดงดำ (Ganoderma sp.)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอป่าปอน จังหวัดพัทลุง	ดอกเห็ดมีขนาด 12.5 x 13.0 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีรูปทรงคล้ายพัด ขอบหยัก ผิวดอกมีสีน้ำตาลแดง ถึง ดำ มันวาว ก้านติดด้านข้างสีเดียวกับหมวก กินได้ มีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์
 เห็ดหิ้งสีส้ม (*Ganoderma valesiacum*)	เก็บตัวอย่าง จากอำเภอควนโดน จังหวัดสตูล	ดอกเห็ดมีขนาด 5.0-10.0 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีรูปทรงคล้ายพัด มีสีส้มแดง สีซีดจางลงเมื่ออายุมากขึ้น ด้านใต้มีสีเดียวกับสีผิว หรือมีสีที่เข้มกว่าสีผิว เป็นซาโปรไฟอยู่กับต้นไม้

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหลินจือที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง (ต่อ)

เห็ดสมุนไพร	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 เห็ดจวักงู (*Amauroderma rugosum* (Blume. & T.Nees.) Tor.)	เก็บตัวอย่าง จากอำเภอเมือง จังหวัดสตูล	เป็นเห็ดที่จัดอยู่ใน Order Ganodermatales มีหมวกเห็ดทรงกลม หรือทรงรี ดอกเห็ดมีขนาด 2.0-20 เซนติเมตร ผิวเรียบมันวาว มักงอกออกมาจากต้นไม้ใหญ่
 เห็ดตะปู/ ดรรชนีนางไม้ (*Xylaria polymorpha*)	เก็บตัวอย่าง จากอำเภอเมือง จังหวัดสตูล	ดอกเห็ดกลมถึงค่อนข้างกลม ขนาด 1.0-3.0เซนติเมตร มีรูปร่างคล้ายกระบอก มีก้านสั้นมาก มีสีดำทั้งดอก
 เห็ดดันหมีม่วงดำ (*Daldania concentrica*)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอป่าปอน จังหวัดพัทลุง	ดอกเห็ดกลมถึงค่อนข้างกลม ขนาด 1.5-6.0 เซนติเมตร เกิดเป็นกลุ่มหรือเดี่ยว ผิวเรียบสีม่วงม่วงอมดำ ถึงสีดำ ผ่าภายในมีวงขาวสลับดำเป็นชั้นๆ ขอบนอกสุดมีสีดำ
 เห็ดปะการังหนามสีเทา (*Clavulina cinerea*)	เก็บตัวอย่างเห็ดจากอำเภอรัฐภูมิ จังหวัดสงขลา	ดอกเห็ดมีทรงพุ่มสูง 4.5-8.0 เซนติเมตร กว้าง 2.5-3.0 เซนติเมตร ประกอบด้วยแขนงหลายแขนงออกจากโคนเดียวกัน ปลายกิ่งแตกเป็น 2 แฉก ปลายแหลมหรือทู่ มีสีเทา

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหลินจือที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง (ต่อ)

เห็ดสมุนไพร	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 เห็ดหลินจือสีแดง (*Ganoderma lucidum*)	เก็บตัวอย่างเห็ดจาก อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา	ดอกเห็ดมีขนาด3-3.5 ซม. มีสีน้ำตาลแดงถึงสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเป็นรูปพัด ผิวเรียบเป็นมันวาว ขอบของดอกเห็ดมีสีขาวอมเหลือง ก้านดอกมีสีน้ำตาลเข้ม ยาวประมาณ 2.5-3.0 เซนติเมตร
 เห็ดปะการังหนามม่วง *(Ramariopsis pulchella)*	เก็บตัวอย่างเห็ดจาก อำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา	ดอกเห็ดเกอดเป็นกลุ่ม เป็นพุ่ม สูงประมาณ 8 ซม. กว้าง 7 ซม. ประกอบด้วยก้านหลายก้านมักบิดตัว โคนก้านอาจเชื่อมต่อหรือแยก การแตกกิ่งแตกเป็น 2 แฉกเสมอ 3-4 ครั้ง ลักษณะของง่ามแฉกเป็นรูปโค้ง ปลายของแขนงมน สีม่วงขุ่นถึงสีครีมอมชมพูเปราะ หักง่าย สีม่วงไม่เปลี่ยนสีเมื่อหัก
 เห็ดปะการังอ่อนเหลืองนวล *(Ramaria concolor)*	เก็บตัวอย่างเห็ดจาก อำเภอ รัตภูมิ จังหวัดสงขลา	ดอกเห็ดขนาดกลางทรงพุ่ม แผ่กว้าง 5-15 ซม. สูงถึง 10 ซม. ดอกรูปร่างและสีคล้ายปะการังอ่อน มีโคน 1 โคน โคนอ้วน สีเหลืองหรือเหลืองอมน้ำตาลเหมือนกันตลอด แตกแขนงจากส่วนโคน แขนงกลวง แขนกแตกออกเป็นแฉก โคนแขนงสีเหลืองหม่น ปลายแขนงมีสีเดียวกัน ผิวไม่มีรอยย่น พบช่วงกลางถึงปลายฤดูฝน

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหลินจือที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง (ต่อ)

เห็ดสมุนไพร	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 เห็ดหิ้งสีม่วงกุหลาบ (*Fomitopsis feei* (Fr.) Ryv)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอ ควนโดน จังหวัดสตูล	ดอกเห็ดขนาดกว้าง 3-10 ซม. ผิวดอกสีแดงถึงสีเทาชมพูหรือน้ำตาลอมชมพู เมื่ออายุมากขึ้นมีขนละเอียด ผิวเรียบ ผิวดอกไม่แตก ผิวใต้ดอกออกสีชมพู แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง พบบนตอไม้ ออกดอกเดียวหรือเกาะกันเป็นกลุ่ม ขอบดอกอาจเชื่อมต่อกัน พบบนตอไม้สนมากกว่าบนไม้ยืนต้นทั่วไป พบได้ตลอดปี
 เห็ดหิ้งเขาวงกตบาง (*Daedaleopsis confragosa*)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอควนโดน จังหวัดสตูล	ดอกเห็ดขนาด 3-15.5 ซม. รูปร่างแบนบางคล้ายพัด ครึ่งวงกลม ไม่มีก้าน แข็ง ผิวดอกไม่เรียบ มีวงแหวนสีเข้มอ่อนซ้อนกัน สีฟางข้าว เหลืองอมน้ำตาลถึงน้ำตาลอมส้ม ดำคล้ำ ขอบหมวกบาง เนื้อดอกสีขาวหรือน้ำตาลจาง ด้านใต้ดอกมีรูยาวคล้ายครีบ พบเป็นกลุ่มหรือเดี่ยวบนไม้เนื้อแข็งที่ตายแล้ว
 เห็ดหนังช้าง (*Amauroderma amoiense*)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอป่าปอน จังหวัดพัทลุง	ดอกเห็ดเกิดดอกเดี่ยวขนาด 20-25 ซม. ลักษณะดอกค่อนข้างกลม แผ่แบน ผิวหมวกดอกปกคลุมด้วยขนเล็กๆคล้ายกำมะหยี่ มีลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลดำสลับน้ำตาลอมชมพู ผิวเป็นลอนคลื่นขนาดเล็กสลับใหญ่ตามรัศมีของดอก ก้านดอกติดตรงกึ่งกลางดอกหรือเยื้องเล็กน้อย ก้านค่อนข้างกลม เนื้อดอกสีจางกว่าสีผิวดอก ใต้หมวกมีรูสีขาว เจริญมาจากรากไม้ที่ฝังจมดิน

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหลินจือที่พบในเขตภาคใต้ตอนล่าง (ต่อ)

เห็ดสมุนไพร	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 เห็ดหลินจือดำด้าน (*Amauroderma rugosum*)	เก็บตัวอย่างจาก อำเภอป่าปอน จังหวัดพัทลุง	ดอกเห็ดเกิดดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ขนาดกว้าง 4-4.5 ซม. ยาว 4-4.5 ซม. ดอกทรงจวัก ผิวหมวกดอกปกคลุมด้วยขนละเอียดคล้ายกำมะหยี่ สีน้ำตาลดำสลับจางมองดูเป็นวงซ้อนกัน กานดอกติดตรงกลางหรือด้านหลัง เนื้อดอกสีเหลืองถึงสีเนื้อ ด้านใต้หมวกสีขาวถึงเทา ผิวของรูสีขาวถึงสีครีม เมื่อสัมผัสเปลี่ยนจากสีแดงสดเป็นสีดำ เจริญเติบโตบนพื้นดิน

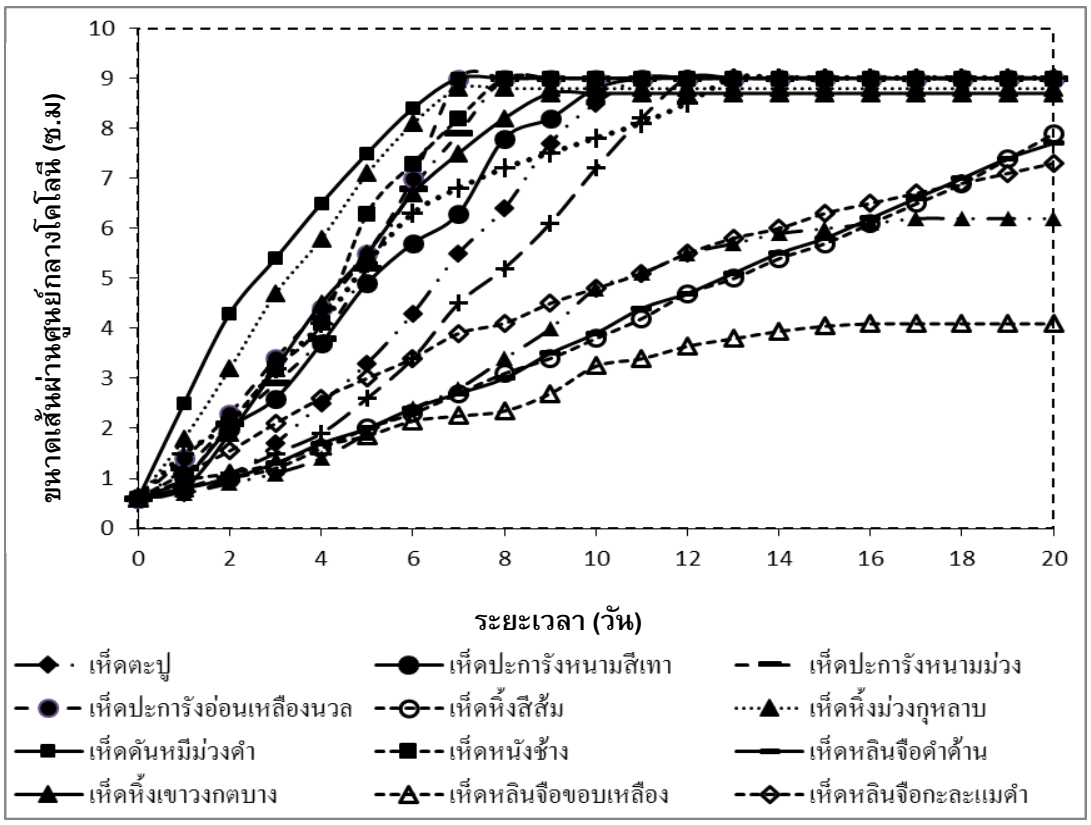
3.1.2 ผลการวิเคราะห์การเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-ß-1,3-glucan

3.1.2.1 ผลการทดสอบลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพร

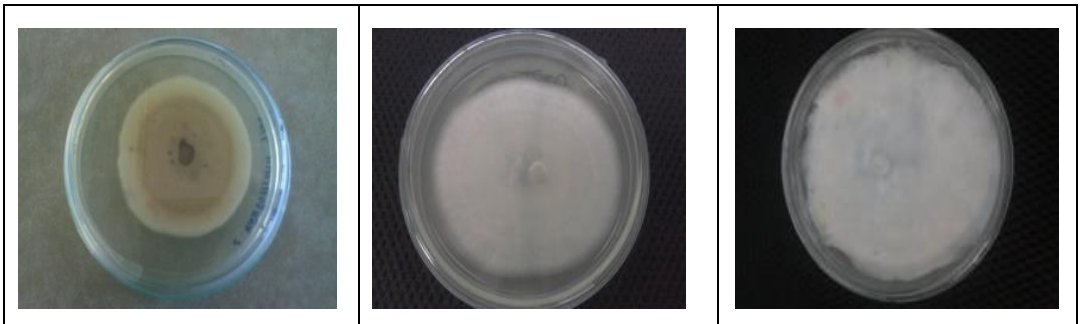
จากผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดสมุนไพรที่เก็บได้จากภาคใต้ตอนล่างทั้ง 15 ชนิด บนอาหารแข็งพีดีเอเป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าเชื้อเห็ดสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ เห็ดตะปู/ดรรชนีนางไม้ เห็ดปะการังหนามสีเทา เห็ดปะการังหนามม่วง เห็ดปะการังอ่อนเหลือง เห็ดดันหมีม่วงดำ เห็ดหนังช้าง และเห็ดหลินจือน้ำตาลแดงดำ มีการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9-15 วัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อเห็ดสมุนไพรอยู่ที่ 9 เซนติเมตร ส่วนเห็ดสมุนไพรที่เหลือจะหยุดการเจริญเติบที่ระยะเวลา 9-20 วัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อเห็ดสมุนไพรอยู่ในช่วง 4.1-8.8เซนติเมตร (รูปที่ 3.1)

ลักษณะเส้นใยของเห็ดสมุนไพรทุกชนิดที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอจะยึดเกาะกันหนาแน่นกับพื้นผิวด้านบนของตัวอาหารแข็ง โดยเส้นใยในระยะแรกของการเจริญเติบโตจะมีสีขาวเมื่อผ่านไป 10-12 วัน เส้นใยของเห็ดสมุนไพรบางชนิดจะมีการเปลี่ยนสี โดยจะเริ่มเปลี่ยนจากตรงกลางของโคโลนีแล้วค่อยๆขยายไปเรื่อยๆ จนมีสีเข้มเมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 20 วัน เช่น เห็ดหลินจือดำด้าน เห็ดหนังช้าง เห็ดหิ้งสีส้ม เห็ดหิ้งม่วงกุหลาบ และเห็ดปะการังอ่อนเหลืองนวล สีของเส้นใยจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อนในวันท้ายๆของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ส่วนเห็ดหลินจือกะละแมดำเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อนใน

วันท้ายๆของการเพาะเลี้ยง เห็ดดันหมีม่วงดำและเห็ดปะการังหนามม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน และเห็ดตะปู/ดรรชนีนางไม่จะเปลี่ยนเป็นสีดำในวันท้ายๆของการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 3.2) สีที่เกิดขึ้นเกิดจากของเสียที่เห็ดปลดปล่อยออกมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเส้นใยเห็ดที่จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคลสไปเป็นคาร์บอนเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด โดยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงสีน้ำตาลเข้มเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2552)

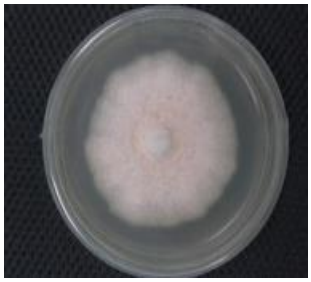
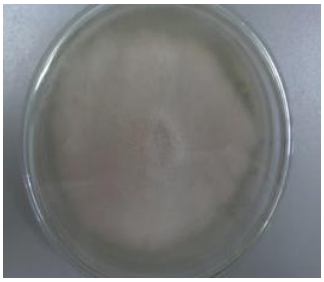
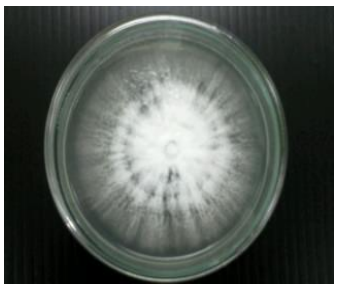
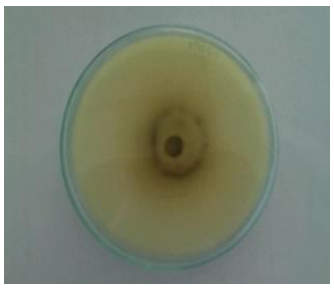
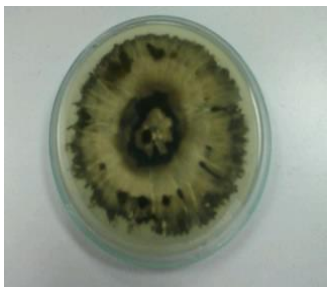
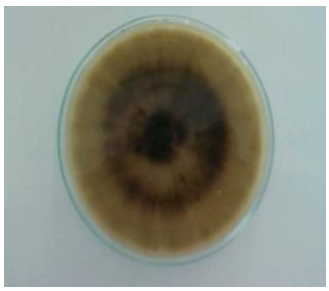


รูปที่ 3.1 ลักษณะการเจริญเส้นใยของเห็ดสมุนไพรเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วัน



รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของโคโลนีของเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ

ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

		
เห็ดหลินจือสีแดง	เห็ดหลินจือกะละแมดำ	เห็ดจวักงู
เห็ดหิ้งสีส้ม	เห็ดดันหมีม่วงดำ	เห็ดหนังช้าง
		
เห็ดหิ้งเขาวงกตบาง	เห็ดปะการังหนาสีเทา	เห็ดหิ้งม่วงกุหลาบ
		
เห็ดตะปู/ดรรชนีนางไม้	เห็ดปะการังหนามม่วง	เห็ดปะการังอ่อนเหลืองนวล

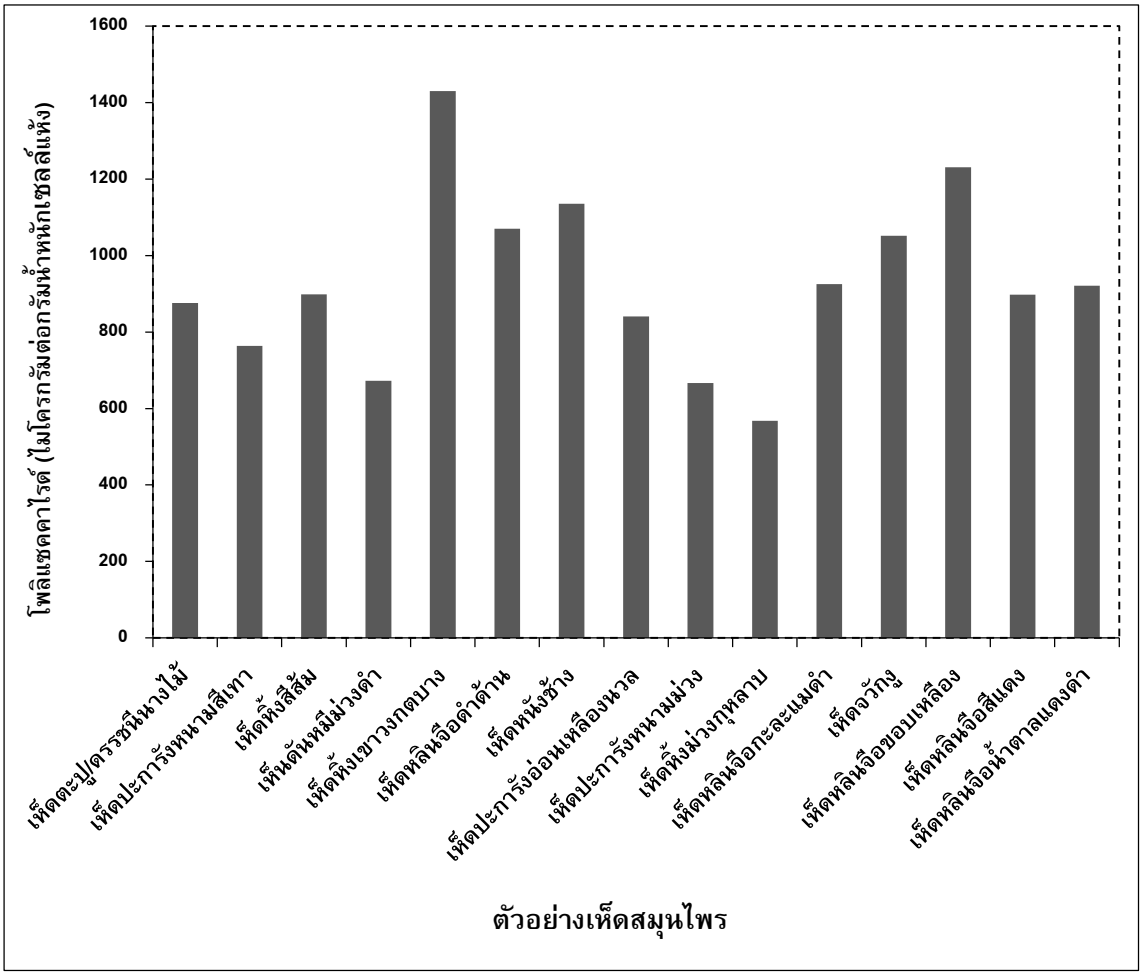
รูปที่ 3.2 การเจริญเติบโตของโคโลนีของเห็ดสมุนไพรที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ต่อ)

3.1.2.2 การทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดสมุนไพรในอาหารเหลวเอสพีดีบี

จากการทดสอบความสามารถในการเจริญของเห็ดสมุนไพรที่เก็บได้จากภาคใต้ตอนล่าง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อเห็ดสมุนไพรทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวเอสพีดีบี ประกอบด้วยมันเทศ 250 กรัม กลูโคส 20 กรัม เปปโทน 1 กรัม วิตามินบีหก 0.5 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อเห็ดจะมีสีขาวเมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 5-8 วัน และเส้นใยของเชื้อเห็ดเจริญเติบโตจนเต็มฟลาสก์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 วัน ซึ่งลักษณะสีและความหนาแน่นของเส้นใยเห็ดจะเปลี่ยนไปตามแต่ละชนิดของเห็ด หลังจากเก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดและนำไปทำแห้งแวจึงนำไปสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

1) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดสมุนไพรที่เก็บได้จากภาคใต้ตอนล่างทั้ง 15 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี พบว่าเชื้อเห็ดหิ้งเขาวงกตบาง เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดหนังช้าง เห็ดหลินจือดำด้าน และเห็ดจวักงู ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ในช่วง 1,052.14-1,429.83 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 3.3) โดยเชื้อเห็ดหิ้งเขาวงกตบางจะให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรสูงสุดที่ 1,429.83 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งรองลงมาคือเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ 1,231.14 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดหูหนูสีน้ำตาล เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดเปาอื๋อ ที่ศึกษาและวิจัยโดย สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ (2553) พบว่าเห็ดสมุนไพรดังกล่าวมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 190-330 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์น้อยกว่าเห็ดหิ้งเขาวงกตบาง เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดหนังช้าง เห็ดหลินจือดำด้าน และเห็ดจวักงู ที่ให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดในช่วง 1,052.14-1,429.83 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดหลินจือพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ที่ศึกษาวิจัยโดย มุกดา คูหิรัญ และปาริชาติ ภูสว่าง (2545) ซึ่งพบว่าปริมาณของโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดหลินจือพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 24,780-48.940 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสารโพลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดหิ้งเขาวงกตบาง เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดหนังช้าง เห็ดหลินจือดำด้าน และเห็ดจวักงู ส่วน



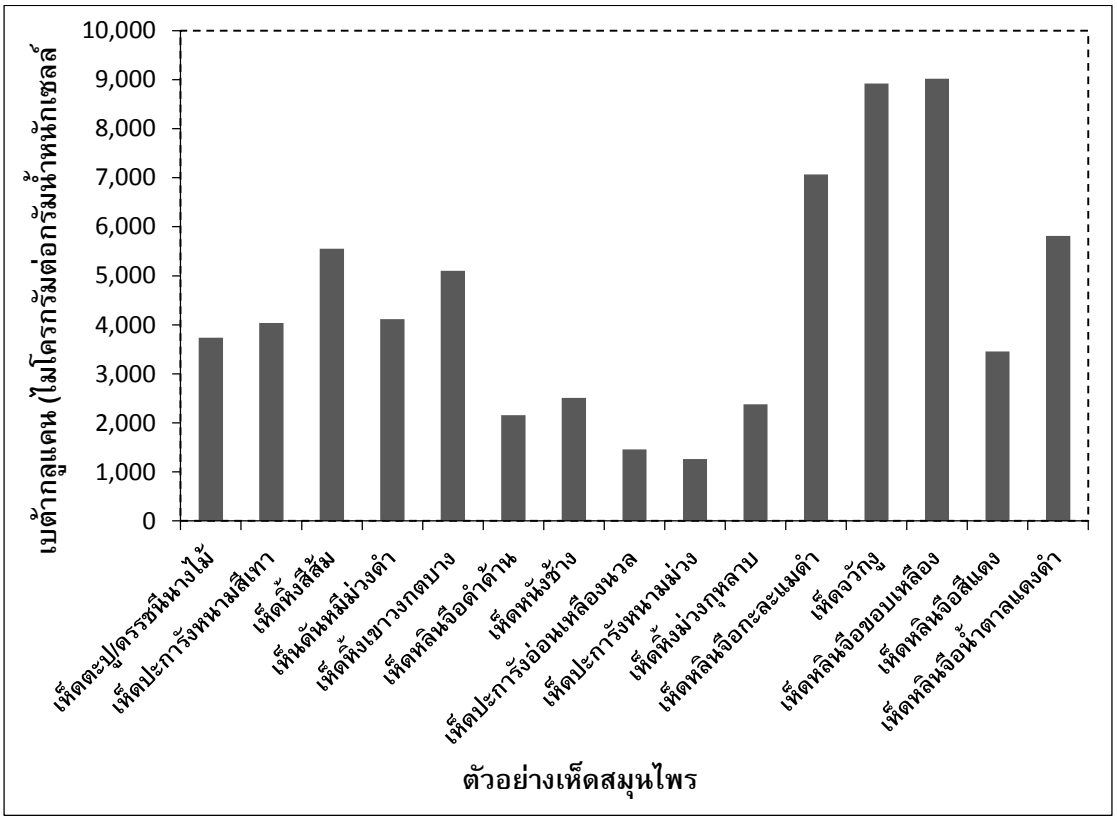
รูปที่ 3.3 ปริมาณสารเอนโดโพลิแซคคาไรด์ของตัวอย่างเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

2) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่ได้จากเส้นใยแห้งของเห็ดสมุนไพรทั้ง 15 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี พบว่าเห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดจวักงู และเห็ดหลินจือกะละแมดำสามารถผลิตสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ปริมาณสูงสุดอยู่ในช่วง 7,064.88-9,021.56 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 3.4) โดยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองให้ปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุดที่ 9,021.56 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง รองลงมาคือเชื้อเห็ดจวักงูที่ 8,924.21 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่ได้จากเห็ดตระกูลนางรม (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus enyngii*, *Pleurotus pulmunarius*) ซึ่งอยู่ในช่วง 2,200-5,300 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Manzi and Pizzoferrato, 2000) เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดจวักงู และเห็ดหลินจือกะละแมดำจะมีปริมาณสารเอนโดเบต้ากลูแคนมากกว่า

แต่จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้จากเห็ดสมุนไพรทั้ง 15 สายพันธุ์จะเห็นได้ว่าปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ มีค่าน้อยกว่าปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ทั้งนี้เนื่องมาจากในขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์นั้น ได้ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานเพียงชนิดเดียวเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้ ซึ่งในสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้นั้น ยังมีน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบที่ผสมอยู่ด้วย เมื่อทำการวิเคราะห์จึงไม่มีปริมาณน้ำตาลชนิดอื่นๆ ทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีปริมาณน้อยกว่า (Wasser, 2002)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร การวิเคราะห์สารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ จะเลือกพิจารณาเฉพาะส่วนของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือซึ่งอยู่ในรูปของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ เนื่องจากการทดลองที่เลือก ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแบบนิ่ง ทำให้เส้นใยเห็ดผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ออกมาในรูปของเอนโดพอลิแซคคาไรด์มากกว่าเอกโซพอลิแซคคาไรด์ จึงเลือกพิจารณาสารที่ผลิตออกมาได้ในสัดส่วนที่มากกว่า และอยากให้เกิดความหลากหลายของงานวิจัย เนื่องจากงานวิจัยอื่นๆก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่จะให้ความสนใจเฉพาะสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์เท่านั้น (Lee *et al*., 2007)



รูปที่ 3.4 ปริมาณสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ของตัวอย่างเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบีในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

จากผลการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโต การผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดสมุนไพรทั้ง 15 สายพันธุ์ เห็นได้ว่าเห็ดหลินจือขอบเหลืองและเห็ดหลินจือกะละแมดำมีความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเหลวเอสพีดีบีได้ดีกว่าเห็ดสมุนไพรสายพันธุ์ โดยเฉพาะเห็ดหลินจือขอบเหลืองนอกจากจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวเอสพีดีบีแล้วยังสามารถผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ได้ปริมาณสูงสุด ดังนั้นจึงคัดเลือกเห็ดหลินจือขอบเหลืองสำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดหลินจือในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

3.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (จากบ่อที่ 3 ของระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบ Facultative pond พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 7.93 ค่าซีโอดีเท่ากับ 7,286.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าของแข็งทั้งหมดอยู่ที่ 13,620 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณธาตุอาหารอื่นๆในน้ำทิ้ง ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก และสารประกอบฟีนอล อยู่ที่ 4.30, 436.66, 14.96, 280.10, 0.93 และ 80.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) ตามรายงานของ Rupani และคณะ (2010) และ Wu และคณะ (2007) พบว่า น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.7 ของแข็งทั้งหมดเท่ากับ 25,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโอดีเท่ากับ 40,563 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณแร่ธาตุในน้ำทิ้ง ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด เหล็ก โพแทสเซียม มีค่าเท่ากับ 750, 180, 46.5, และ 2,270 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Bunrung และคณะ (2014) รายงานปริมาณของสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มไว้ที่ 965 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วองค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้จะมีค่าต่ำกว่าค่าที่เคยรายงายไว้ เนื่องจากน้ำทิ้งจากตอนกลางของระบบบำบัดจะเกิดกระบวนการบำบัดไปบ้างบางส่วนแล้ว ทำให้สารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งมีปริมาณความเข้มข้นลดลง แต่ยังคงเหลือสารอาหารส่วนที่เป็นประโยชน์ ดังนั้นน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มน่าจะนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือได้

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณที่พบในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
pH	7.93
Chemical Oxygen Demand	7,286.4 mg/l
Total Solids	13,620 mg/l
Carbohydrate	4.30 mg/l
Total Kjeldahl Nitrogen	436.66 mg/l
Total Phosphorus	14.96 mg/l
Total Potassium	280.1 mg/l
Iron	0.93 mg/l
Phenols	80.40 mg/l
C:N ratio	21

3.2.2 ผลการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

จากการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหลินจือจากข้อ 3.1 นำเชื้อเห็ดหลินจือที่ได้มาเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะนิ่ง ด้วยวิธี Disk inoculum พบว่า เชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองไม่สามารถเจริญได้เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จึงได้ทำการแก้ปัญหาโดยเปลี่ยนรูปแบบการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ด้วยการทดลองใช้วิธี Seed inoculum ทดแทนการเตรียมเชื้อเริ่มต้นแบบเก่า

โดยการนำเชื้อเห็ดหลินจือที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งพีดีเอ ตัดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยก Seed และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำ Seed ที่ได้ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับวิธี Disk inoculum พบว่า วิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นแบบ Seed inoculum เส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามรถเจริญได้ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยเส้นใยเห็ดจะเกิดการเจริญเติบโตลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ลักษณะของเส้นใยมีสีขาว จับตัวกันเป็นแผ่นบางๆ ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 0.6 กรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 วัน

การเตรียมเชื้อด้วยวิธี Disk inoculum เส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากลักษณะของเชื้อที่เป็นเส้นใยอยู่บนอาหารแข็ง เมื่อนำไปใส่ลงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยตรงทำให้เชื้อต้องเกิดการปรับตัวโดยจะอยู่ในระยะ lag phase เป็นระยะเวลานานเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมัน

ปาล์ม โดยวิธีนี้จะทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ต่ำเนื่องจากมีสภาวะกดดันสูงจากสภาพแวดล้อมของอาหารที่เปลี่ยนจากของแข็งเป็นของเหลว ส่วนวิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นแบบ Seed inoculum นี้เส้นใยของเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบีก่อนแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะสามารถปรับตัวได้มากกว่าเนื่องจากสภาวะกดดันจากสภาพแวดล้อมของอาหารน้อยกว่าจึงทำให้เส้นใยของเห็ดเจริญเติบโตได้สูง นอกจากนี้ลักษณะของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวก่อนจะเป็น Pellet และมีสารเมือกหุ้มอยู่รอบๆ ซึ่งสามารถช่วยในการปรับตัวเมื่ออยู่ในอาหารที่อาจมีสารพิษได้ดีกว่าเชื้อที่อยู่ลักษณะเป็นเส้นใยโดยทั่วไปจึงมักใช้วิธี Pre-culture เพื่อให้เชื้อได้ปรับสภาพ (Acclimatization) และทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายที่ดีกว่า (Wagner *et al.,* 2003)

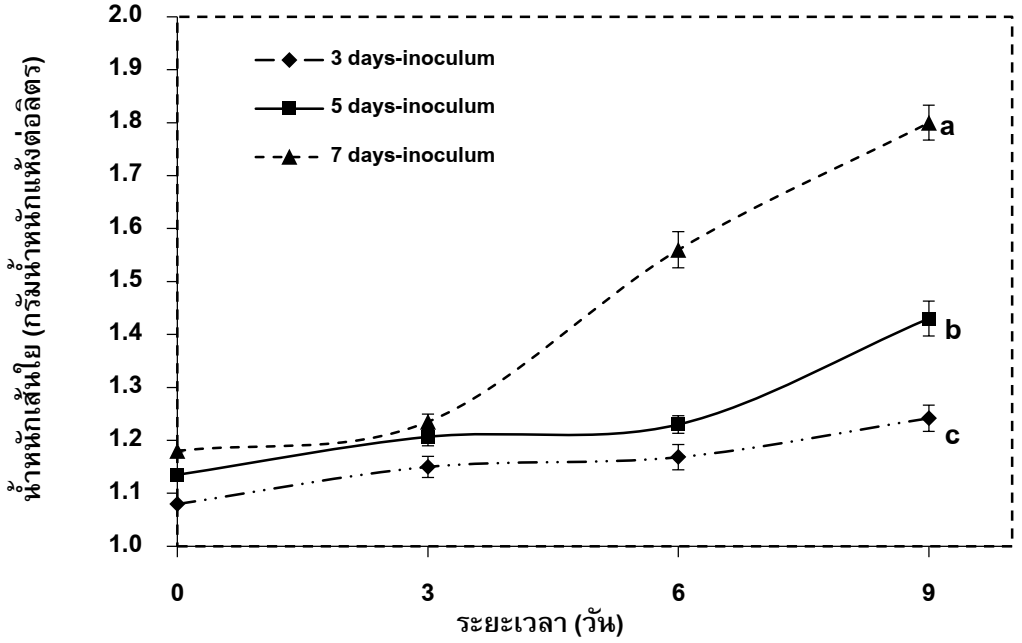
นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า ในขั้นตอนนี้เส้นใยเห็ดหลินจือที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม จะให้ปริมาณเส้นใยน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี เนื่องจากในน้ำทิ้งมีปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการเจริญของเส้นใยน้อยกว่าในอาหารเหลวเอสพีดีบีที่มีส่วนผสมของมันเทศ โดยในมันเทศจะมีน้ำตาลหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เช่น ฟรักโทส กลูโคส และซูโครส เป็นต้น (Aoki and Jongjeen, 2009) หากนำน้ำตาลชนิดเหล่านี้ไปเติมในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะช่วยในการเพิ่มปริมาณเส้นใยที่ผลิตได้

3.2.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียม Seed inoculum

จากการศึกษาพบว่า Seed inoculum ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งของเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ Seed inoculum ที่ระยะเวลาอื่นๆ โดย Seed inoculum ที่ระยะเวลา 7 วัน ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 1.8 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ระยะเวลา 3 และ 5 วัน ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 1.242 และ 1.430 กรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นระยะเวลา 9 วัน (รูปที่ 3.5) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandra และ shoji (2007) ที่ใช้เชื้อเริ่มต้นของ *Lyophyllum decastes* ที่ระยะเวลา 7 วัน เพาะเลี้ยงในอาหารวายเอฟเอ็ม (Yeast fermentation medium: YFM) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดที่ 6.36 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ 0.32 กรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง

Seed inoculum ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่เห็ดหลินจือขอบเหลืองอยู่ในช่วง Log phase ซึ่งเส้นใยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ปริมาณเส้นใยแห้งสูงสุดหลังนำไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม นอกจากนี้Seed inoculum ที่ระยะเวลา 7 วัน จะมีขนาด Pellet ใหญ่

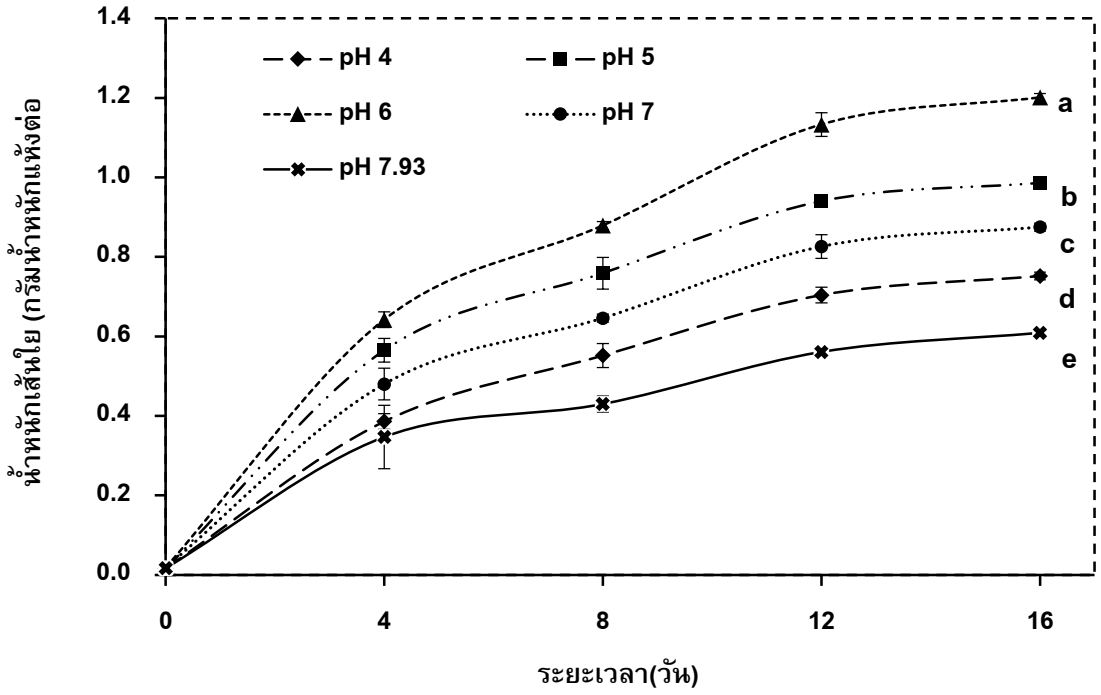
กว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ ทำให้สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้ Seed inoculum ที่ระยะเวลา 7 วัน ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.5 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระยะเวลา Seed inoculum ต่างๆ
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 9 ของการทดลอง

3.2.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือ

จากการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับ 4, 5, 6, 7 และ 7.93 (ชุดควบคุม) เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองโดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3 เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 16 วัน พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 ให้น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองสูงสุดเท่ากับ 1.201 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ โดยที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5 ,7 และ 7.93 ให้น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลือง 0.752, 0.986, 0.875 และ 0.609 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.6)



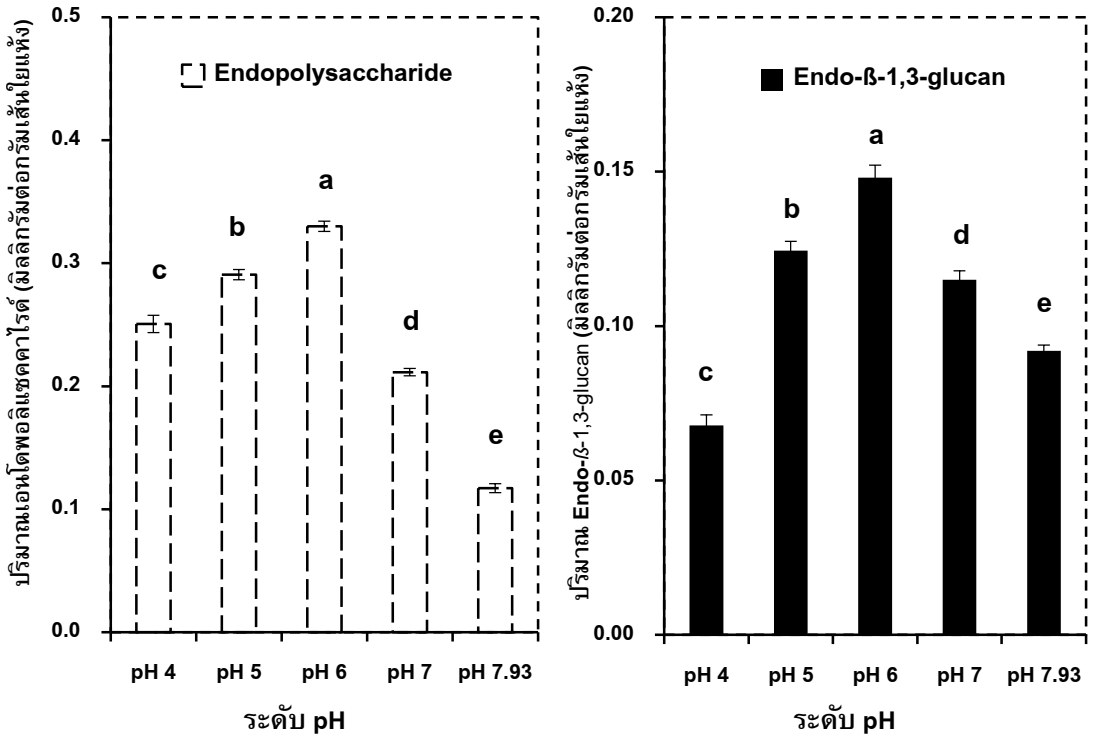
รูปที่ 3.6 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระดับพีเอชเริ่มต้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง

ผลการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 16 วัน ที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 7.93 (ชุดควบคุม) พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสาร เอนโดพอลิแซคคาไรด์ ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ โดยที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่ระดับพีเอชเริ่มต้น 4, 5 ,7 และ 7.93 ให้ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 0.25, 0.29, 0.21 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.7 ก)

ส่วนผลการสกัดสาร Endo-*ß*-1,3-glucan พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ โดยที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ ให้ปริมาณ Endo-*ß*-1,3-glucan เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่ระดับพี

เอชเริ่มต้น 4, 5 ,7 และ 7.93 ให้ปริมาณ Endo-*ß*-1,3-glucan เท่ากับ 0.07, 0.12, 0.12 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.7 ข) ซึ่งระดับพีเอชที่ให้ผลผลิตสูงสุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fang และ Zhong (2002) พบว่าในการการเพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ได้ผลผลิตของชีวมวลสูงสุดที่ 17.3 กรัมต่อลิตรโดยน้ำหนักแห้ง ส่วนเอนโดพอลิแซคคาไรด์ได้ผลผลิตสูงสุดในช่วงของค่าพีเอช 5.5-7.0 ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารจะมีผลต่อการละลายของเกลือในอาหาร รูปร่าง และขนาดของเซลล์ การทำงานของผนังเซลล์ การลำเลียงสารอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้การสร้างผลผลิตของเซลล์เพิ่มขึ้น (Elisashvili, 2012)



ก ข

รูปที่ 3.7 ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ (ก) และ Endo-*ß*-1,3-glucan (ข) ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ระดับพีเอชเริ่มต้นต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง

จากผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต การผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 7.93 (ชุดควบคุม) เห็นได้ว่า เห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 สามารถ

เจริญเติบโต ผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

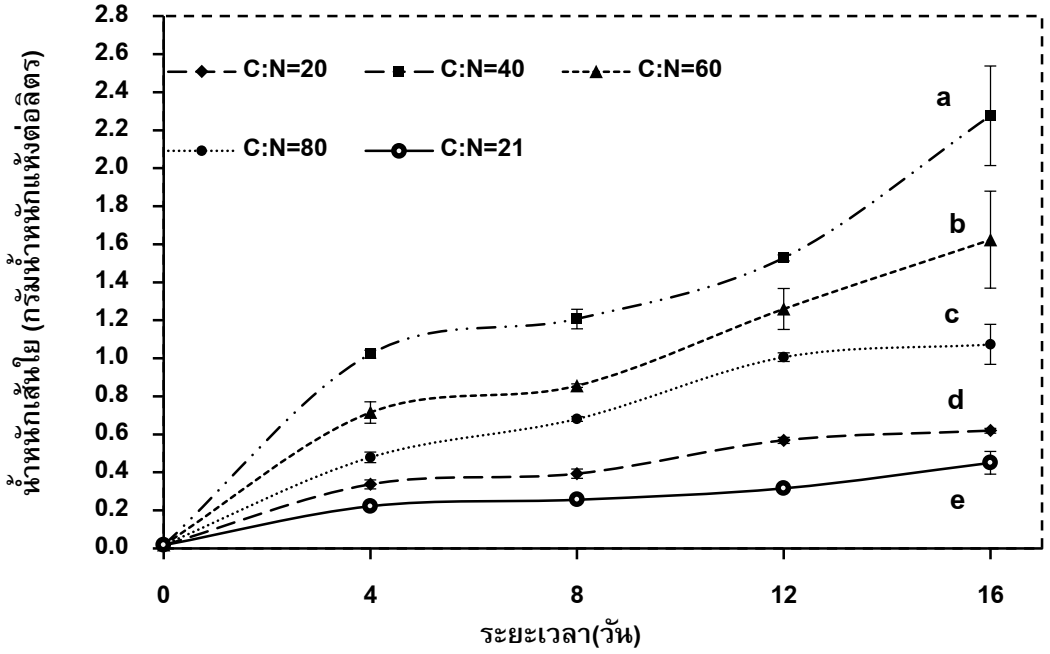
3.2.5 ผลการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 21 (ชุดควบคุม) โดยใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.4 เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 16 วัน พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 16 เท่ากับ 2.276 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 60, 80 และ 21 น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 16 เท่ากับ 0.619, 1.624, 1.073 และ 0.450 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.8)

ผลการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 16 วัน ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 21 (ชุดควบคุม) พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 มีความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 60, 80 และ 21 ความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.18, 0.24, 0.19 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง (รูปที่ 3.9 ก)

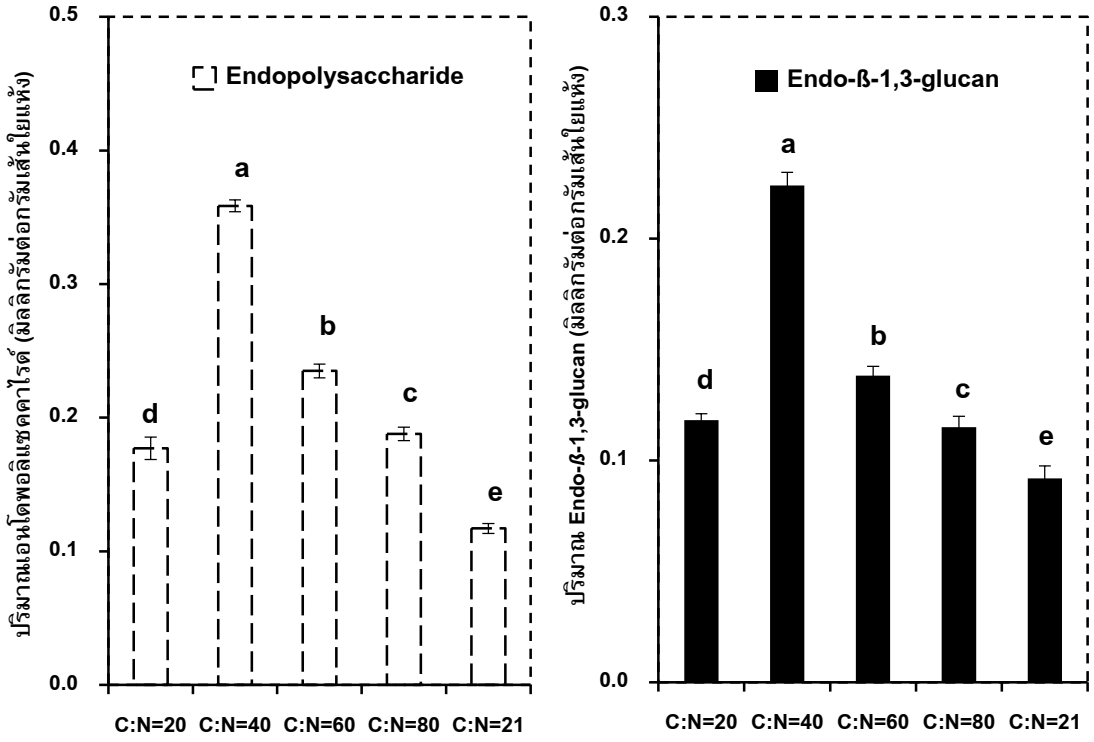
ส่วนผลการสกัดสาร Endo-*ß*-1,3-glucan จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 16 วัน ที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 21 (ชุดควบคุม) พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิต Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ โดยที่

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 มีความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 60, 80 และ 21 ความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 0.12, 0.14, 0.12 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.9 ข) จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Lee และคณะ (2007) ที่เพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือหูช้าง (*Ganoderma applanatum* KFRI 646) ใน Basal medium ที่มีการปรับระดับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสคงที่ที่ 40 กรัมต่อลิตร แล้วปรับความเข้มข้นของไนโตรเจน พบว่า เมื่อระดับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 43 จะผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ปริมาณสูงสุด 2.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อระดับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงขึ้นปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์จะลดลง ส่วนปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์การปรับระดับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนไม่มีผลต่อการผลิต นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนซึ่งมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเห็ดหลินจือสีแดงจะแตกต่างกันเมื่อมีสายพันธุ์ต่างกัน (Yuan *et al.,* 2012)



รูปที่ 3.8 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่งและมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง



ก ข

รูปที่ 3.9 ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ (ก) และ Endo-*ß*-1,3-glucan (ข) ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง

การเลือกช่วงของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ในทดลองมีค่าสูง เนื่องจากในกระบวนการการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดต้องใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อคาร์บอนที่ได้จากอาหารหมดลงนั้น เส้นใยจะนำสารพอลิแซคคาไรด์ที่เก็บไว้ในเซลล์มาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน การเลือกใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ต่ำเกินไปอาจทำให้ได้ผลผลิตของสารพอลิแซคคาไรด์ลดลง (Hsieh *et al*., 2005)

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญในอาหารซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตสารต่างๆของเห็ด แหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ กลูโคส แล็กโทส และซูโครส จากงานวิจัยของ Tang และ Zhong (2002) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* มีผลต่อการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ และกรดกาโนเดอริก โดยในการผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ กรดกาโนเดอริก และน้ำหนักเส้นใยแห้ง แหล่งคาร์บอนที่เป็นแล็กโทสจะให้ผลผลิตสูงสุด รองลงมาคือ กลูโคส และซูโครส ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ และอัตราการเจริญต่อวัน แหล่งคาร์บอนที่

เป็นซูโครสจะให้ผลผลิตสูงสุด รองลงมาคือ กลูโคส และแล็กโทส ตามลำดับ ซึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์นั้น แหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส เช่น น้ำตาลทรายแดง (Brown sugar) จะมีราคาต่ำกว่ากลูโคส และแล็กโทส สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ Chang และคณะ (2006) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* โดยใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอน จะให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง และปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์สูงกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส และแล็กโทส

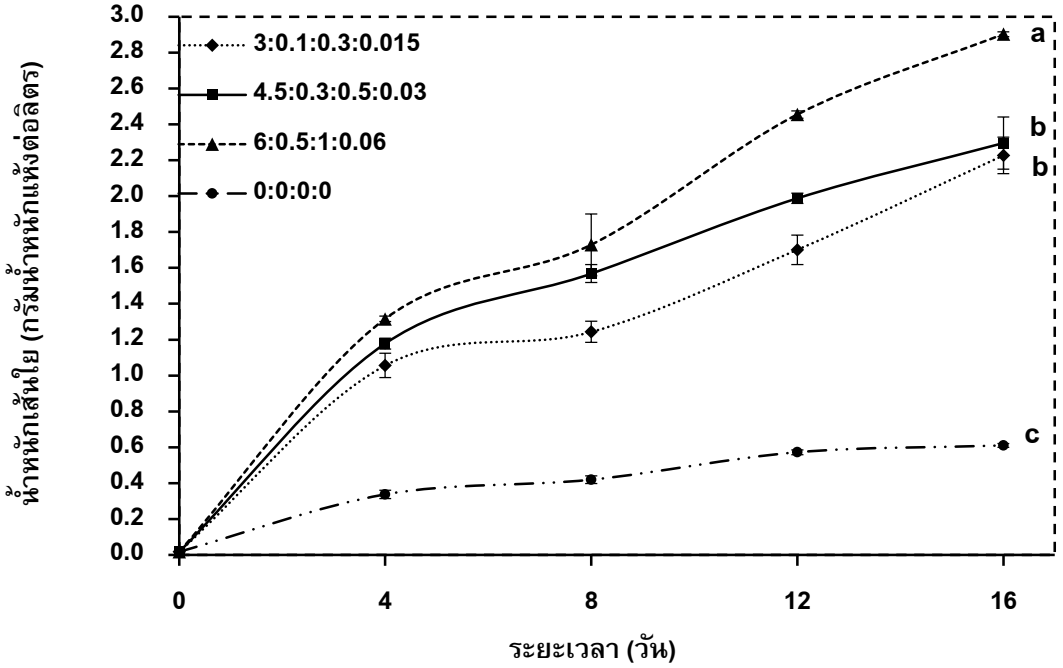
แหล่งไนโตรเจนก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในอาหารเพาะเลี้ยงเห็ด โดยไนโตรเจนมีความสำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์บางชนิดและกระบวนการเมตาบอลิซึมในเห็ด แหล่งไนโตรเจนส่วนใหญ่ที่ใช้จะอยู่ในรูปของ แอมโมเนียมไนเตรตไอออน หรือสารอินทรีย์ (เช่น กรดอะมิโน หรือโปรตีน) อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการสังเคราะห์สารพอลิแซคคาไรด์ในการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ (Elisashvili, 2012)

จากผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต การผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 21 (ชุดควบคุม) เห็นได้ว่า เห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 สามารถเจริญเติบโต ผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2.6 ผลการศึกษาอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03, 6:0.5:1:0.06 และ 0:0:0:0 (ชุดควบคุม) มิลลิโมลต่อลิตร โดยใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นและอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.5 เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 16 วัน พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนแร่ธาตุอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 16 เท่ากับ 2.903 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ส่วนที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03 และ 0:0:0:0 มิลลิ

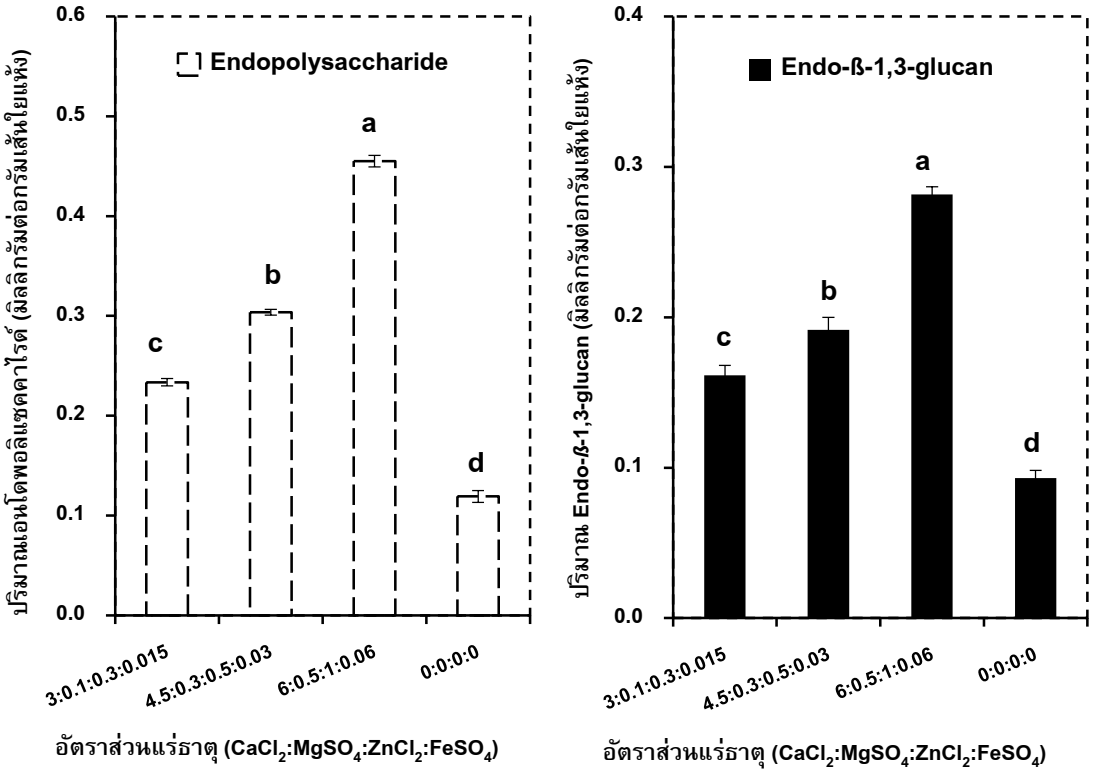
โมลต่อลิตร น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 16 เท่ากับ 2.227, 2.296 และ 0.610 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.10)



รูปที่ 3.10 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนแร่ธาตุต่าง ๆ (มิลลิโมลต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง

ผลการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 16 วัน ที่อัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03, 6:0.5:1:0.06 และ 0:0:0:0 (ชุดควบคุม) มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนแร่ธาตุอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร มีความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.46 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03 และ 0:0:0:0 มิลลิโมลต่อลิตร ความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.23, 0.30 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง (รูปที่ 3.11 ก)



ก ข

รูปที่ 3.11 ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ (ก) และ Endo-*ß*-1,3-glucan (ข) ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราส่วนแร่ธาตุต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 16 ของการทดลอง

ส่วนผลการสกัดสาร Endo-*ß*-1,3-glucan พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนแร่ธาตุอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร มีความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ส่วนที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03 และ 0:0:0:0 มิลลิโมลต่อลิตร ความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 0.16, 0.19 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง (รูปที่ 3.11 ข) ผลการทดทองที่ได้มีปริมาณสารเอนโดพอลิ แซคคาไรด์น้อยกว่างานวิจัยของ Cui และ Zhang (2011) ที่เพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* ใน Basal medium ที่เติมแหล่งแร่ธาตุด้วยสาร Na_2SeO_3, $ZnSO_4$, $MgSo_4$, $FeSO_4$, และ $CrSO_4$ ความเข้มข้น 25-200 ppm เลี้ยงในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน

พบว่า Se^{2+} ที่ความเข้มข้น 20 ppm สร้างสารเอนโดและเอกโซพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ระดับ 183±10.2 และ 248±5.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ Zn^{2+} และ Fe^{2+} ที่ความเข้มข้น 50 ppm สร้างสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ระดับ 170±0.8 และ 174±5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสร้างสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ระดับ 263±4.0 และ 254.3±8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Mg^{2+} ไม่มีผลต่อกระบวนการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ ตรงกันข้ามกับ Cr^{2+} ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความเข้มข้นของ Zn^{2+} และ Fe^{2+} ที่เติมลงในอาหารมีผลต่อขนาดของ Pellet โดยเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ขนาดของ Pellet จะมีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย

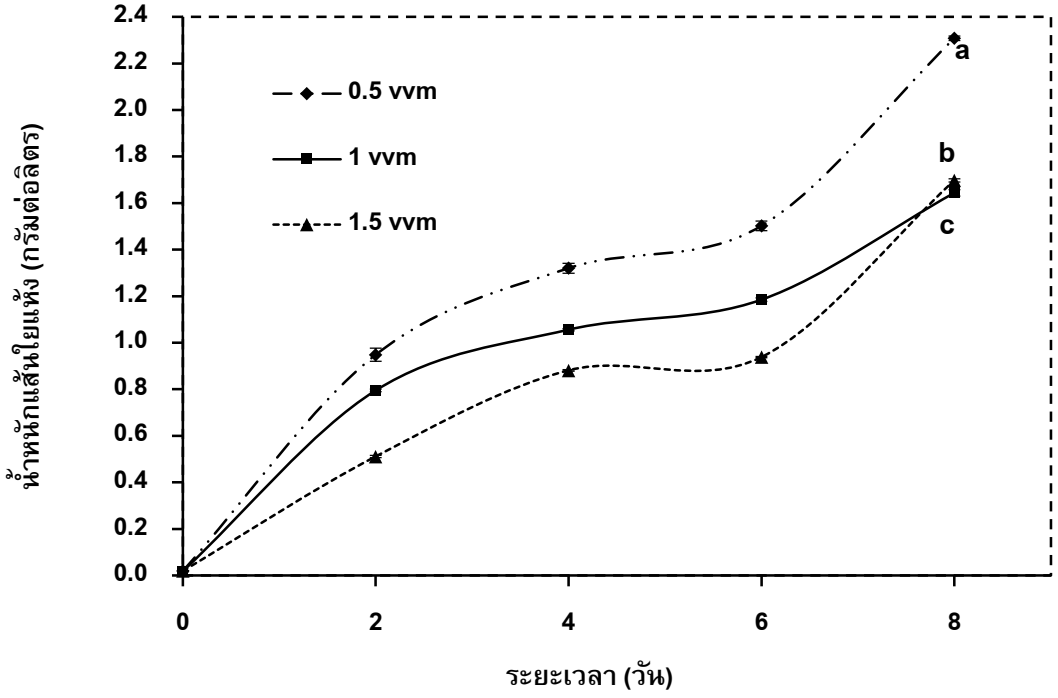
จากงานวิจัยของ Kim และคณะ (2005) ที่เพาะเลี้ยง *Agrocybe cylindracea* ด้วย Basal medium ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 2 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ความเร็วการกวน 150 รอบต่อนาที พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 11 วัน พบว่า เมื่อเติม มอลโทส Martone A-1 $MgSO_4$ และ $CaCl_2$ ความเข้มข้นร้อยละ 8, 0.4, 0.04 และ 0.11 ตามลำดับ จะผลิตสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์สูงสุดที่ระดับ 2.08 กรัมต่อลิตร Ca^{2+} จะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อราซึ่งเกี่ยวข้องกับการขยายตัวของผนังเซลล์และความสามารถในการแทรกซึมของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วน Mg^{2+} เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อเชื้อราในการทำหน้าที่เป็น Cofactor ในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสมดุลของเยื่อหุ้มเซลล์

แร่ธาตุหลายชนิดเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม เหล็ก โคบอลต์ นิกเกิล ทองแดง สังกะสี และโมลิบดีนัม แร่ธาตุจะมีปฏิกิริยาต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโต กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และกระบวนการสร้างเอนไซม์บางชนิดที่ชักนำให้เกิดกระบวนการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเก็บสะสมแร่ธาตุไว้ได้แม้ขณะนั้นในอาหารจะมีแร่ธาตุปริมาณน้อย (Cui and Zhang, 2011)

จากผลการศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโต การผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ *ß*-1,3-glucan ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 และอัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 3:0.1:0.3:0.015, 4.5:0.3:0.5:0.03, 6:0.5:1:0.06 และ 0:0:0:0 (ชุดควบคุม) เห็นได้ว่า เห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 สามารถเจริญเติบโต ผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราส่วนแร่ธาตุอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราส่วนแร่ธาตุเท่ากับ 6:0.5:1:0.06 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2.7 ผลการศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด

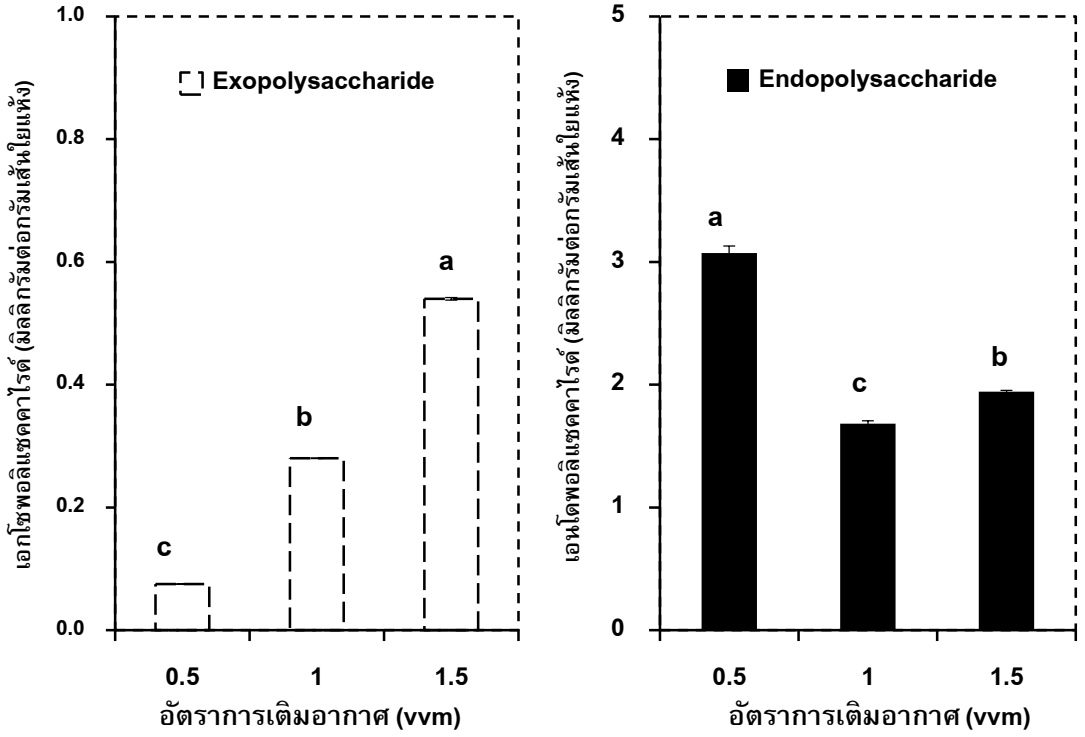
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อัตราส่วนแร่ธาตุ การเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที (ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที: vvm) โดยใช้ค่าพีเอชเริ่มต้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และอัตราส่วนแร่ธาตุที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.6 เพาะเลี้ยงในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเติมอากาศอื่นๆ โดยที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 8 เท่ากับ 2.308 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ส่วนที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที น้ำหนักเส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองในวันที่ 8 เท่ากับ 1.644 และ 1.697 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.12)



รูปที่ 3.12 ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 8 ของการทดลอง

ผลการสกัดสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 8 วัน ที่การเติมอากาศ เท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเติมอากาศอื่นๆ โดยที่การเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที มีความเข้มข้นของสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.540 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 0.075 และ 0.280 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.13 ก)



รูปที่ 3.13 ปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ (ก) และเอนโดพอลิแซคคาไรด์ (ข) ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 8 ของการทดลอง

ส่วนผลการสกัดสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตรา

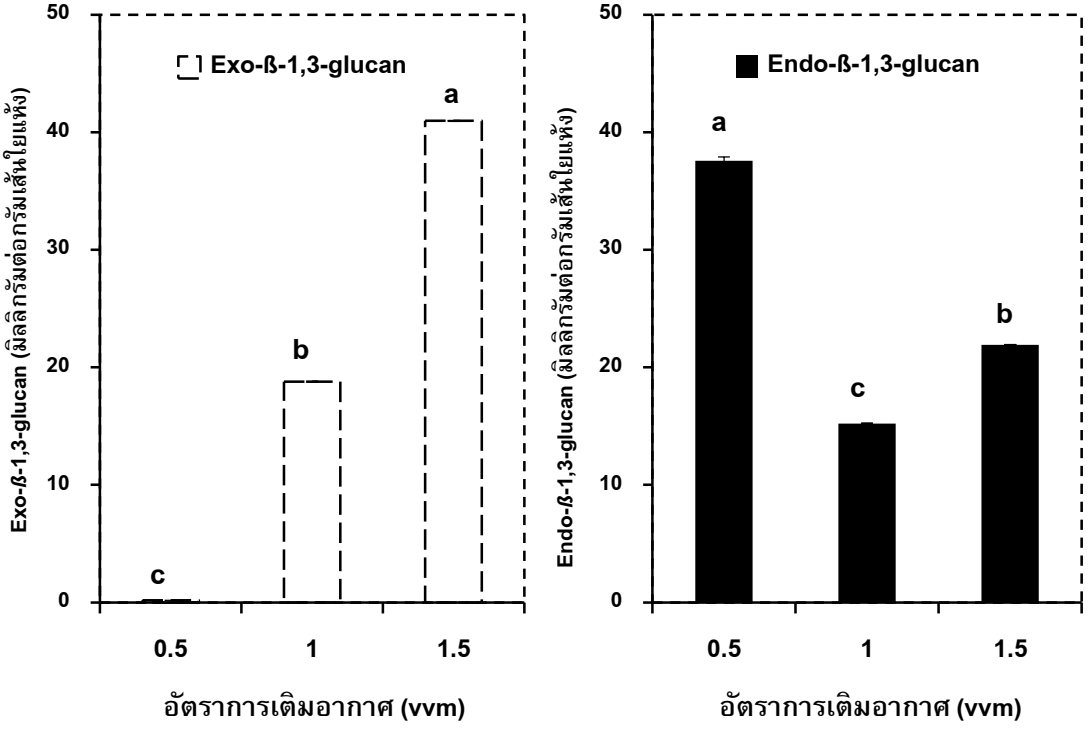
การเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเติมอากาศอื่นๆ โดยที่การเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที มีความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 3.072 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 1.683 และ 1.942 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.13 ข)

ผลการสกัดสาร Exo-*ß*-1,3-glucan จากเส้นใยเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ระยะเวลา 8 วัน ที่การเติมอากาศ เท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสาร Exo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเติมอากาศอื่นๆ โดยที่การเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที มีความเข้มข้นของสาร Exo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 40.962 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 และ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของสาร Exo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 0.191 และ 18.784 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.14 ก)

ส่วนผลการสกัดสาร Endo-*ß*-1,3-glucan พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถผลิตสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่อัตราการเติมอากาศอื่นๆ โดยที่การเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที มีความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 37.570 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของสาร Endo-*ß*-1,3-glucan ที่สกัดได้เท่ากับ 15.218 และ 21.923 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.14 ข)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อมีปริมาณออกซิเจนต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงายวิจัยของ Kim และคณะ (2006) ที่เพาะเลี้ยง *Ganoderma resinaceum* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 35 กรัมต่อลิตร เพปโทน 8 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสคลอไรด์ 5 มิลลิโมลต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 วัน ที่อัตราการเติมอากาศระดับต่างๆ พบว่า ที่ระดับการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ผลิตปริมาณเส้นใยสูงสุด 18.1 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณสารเอกโซพอลิลิแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราการเติมอากาศเท่า 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ในการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลืออยู่ในถังหมักจะลดลงอย่างรวดเร็วในตอนต้นของกระบวนการหมักซึ่งตรงกันข้ามกับ

กระบวนการผลิตเส้นใย และสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อัตราการเติมอากาศในการเพาะเลี้ยงเห็ดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเส้นใยและสารพอลิแซคคาไรด์ โดยการเติมอากาศจะช่วยในการส่งผ่านสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ และออกซิเจน เป็นการรักษาสมดุลความเข้มข้นของสารระหว่างภายนอก และภายในเซลล์ ทำให้เกิดกระบวนการหมักแบบใช้อากาศอย่างมีประสิทธิภาพ (Elisashvili, 2012) อัตราการเติมอากาศที่สูงทำให้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง Pellet ของเชื้อเห็ดจะเกิดการเคลื่อนไหวไปมาอยู่ตลอดเวลาคล้ายกับการเขย่า ทำให้เชื้อเห็ดจะผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ออกมาในรูปของเอกโซพอลิแซคคาไรด์มากกว่าเอนโดพอลิแซคคาไรด์ เนื่องจากการที่เซลล์เคลื่อนที่ไปมาสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตออกมาบนผนังเซลล์ไม่สามารถเกิดการดูดซับเก็บไว้ได้ ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเอกโซพอลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น (Yang and Liu, 1998)



รูปที่ 3.14 ปริมาณสาร Exo-*ß*-1,3-glucan (ก) และ Endo-*ß*-1,3-glucan (ข) ของเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่อัตราการเติมอากาศต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะมืด เป็นระยะเวลา 8 วัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 8 ของการทดลอง

การทดลองในขั้นตอนนี้จึงสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40

และอัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 6:0.5:1:0.06 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ทำให้เชื้อเห็ดมีน้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด และเมื่อใช้อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ทำให้เชื้อเห็ดมีปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์และ Exo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด

จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจะเห็นได้ว่า ปริมาณผลผลิตที่ได้ทั้ง น้ำหนักเส้นใย สารพอลิแซคคาไรด์ และ *ß*-1,3-glucan นั้น มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่อื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากในงานวิจัยอื่นๆ ส่วนใหญ่ได้ใช้อาหารสำเร็จรูปในเพาะเลี้ยง ซึ่งอาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารที่มีสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดอยู่ปริมาณมากกว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และอาหารสำเร็จรูปยังไม่มีสารที่อาจส่งผลต่อการยับยั้งเจริญของเส้นใยเห็ด เช่น สารประกอบฟีนอล (Zabka *et al*., 2013) นอกจากนี้ความแตกต่างของสายพันธุ์ยังมีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดหลินจืออีกด้วย (Papinutti, 2010)

3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

3.3.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงหลังเก็บเกี่ยวผลผลิตเสร็จแล้ว

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลือง (ตารางที่ 3.3) พบว่าน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเริ่มต้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน และอัตราส่วนแร่ธาตุแล้วมีค่าซีโอดี ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และเหล็ก เท่ากับ 16,803, 411.60, 14.96, 280.1 และ 1.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังการเพาะเลี้ยงมีค่า ซีโอดี ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เหล็ก และสารประกอบฟีนอล เท่ากับ 11,362, 85.06, 21.00, 130.50, 2.44 และ 52.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เช่น ไนโตรเจน และโพแทสเซียม มีปริมาณลดลงมาก เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีเหล่านี้เป็นส่วนที่เส้นใยเห็ดนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ค่าซีโอดีในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มมีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากน้ำทิ้งโรงงานงานสกัดน้ำมันปาล์มหลังการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่นำมาวิเคราะห์นั้น ได้กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเส้นใยเห็ดออก ทำให้ในน้ำทิ้งยังมีส่วนของสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยเพิ่มปริมาณค่าซีโอดีในน้ำทิ้งหลังการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกันกับสารประกอบฟีนอลที่ปริมาณความเข้มข้นในน้ำทิ้งหลังการเพาะเลี้ยงลดลง

เล็กน้อย ส่วนฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นนั้นอาจเกิดจากเส้นใยเห็ดที่สามารถผลิตธาตุอาหารชนิดนี้ได้ระหว่างการเจริญเติบโต

ตารางที่ 3.3 ผลการวิเคราะห์น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด

องค์ประกอบทางเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	ก่อนการเพาะเลี้ยง	หลังการเพาะเลี้ยง
Chemical Oxygen Demand	16,803	11,362
Total Kjeldahl Nitrogen	411.60	85.06
Total Phosphorus	14.96	21.00
Total Potassium	280.1	130.50
Iron	1.93	2.44
Phenols	80.40	52.16

3.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในสารที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณเหล็กเท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ทองแดงพบปริมาณน้อยกว่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง และแคดเมียมพบปริมาณน้อยกว่า 0.002 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง โลหะหนักที่พบในสารสกัดจากเส้นใยเห็ดนั้น อาจมาจากการที่เส้นใยเห็ดดูดซับเอาโลหะหนักเข้าไปเก็บไว้ในเซลล์เมื่อต้องนำอาหารซึ่งเป็นน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มไปที่มีโลหะหนักปะปนอยู่ไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานสารปนเปื้อนที่พบในอาหาร (กระทรวงสาธารณะสุข, 2557) พบว่า สารที่สกัดได้มีปริมาณโลหะหนักต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งเห็นได้ว่าสารที่สกัดได้มีความปลอดภัยในระดับหนึ่งหากนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารส่งเสริมด้านสุขภาพ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ความเข้มข้นของโลหะหนักที่พบในสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ชนิดของโลหะหนัก	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง)		ค่ามาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหาร (กระทรวงสาธารณสุข, 2557)
	น้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	สารที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ด	
Iron	0.93	0.39	ไม่ระบุ (ไม่ควรบริโภคเกิน 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน)
Copper	0.002	น้อยกว่า 0.001	20 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
Cadmium	น้อยกว่า 0.003	น้อยกว่า 0.002	0.05 (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

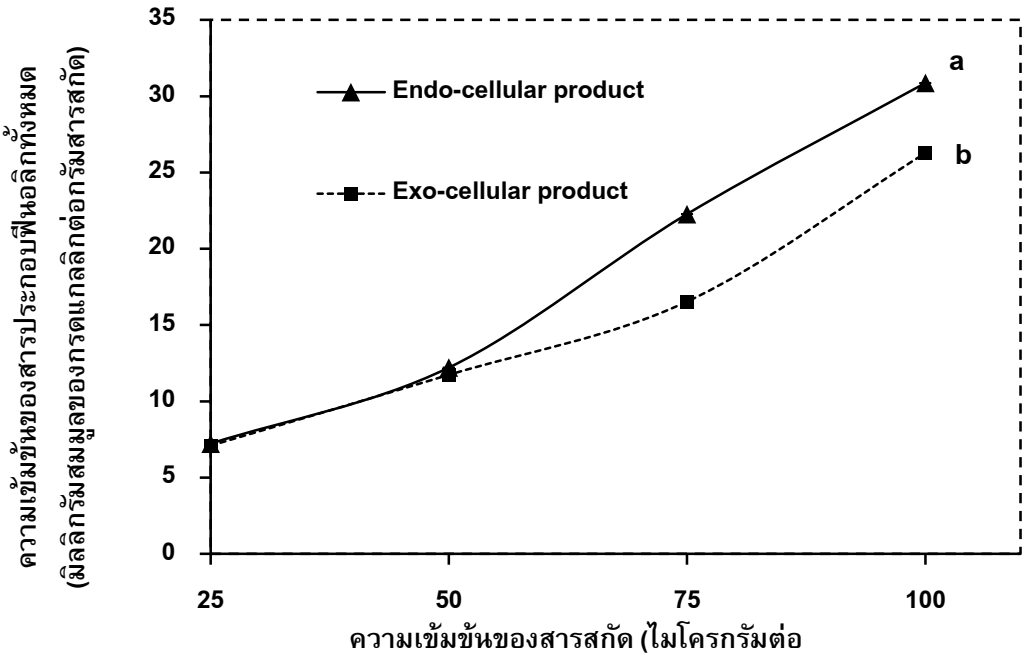
3.3.3 ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

1) ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Total Phenolic content

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของกรดแกลลิก (Gallic acid) จากการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดให้แสดงค่าอยู่ในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก (Gallic Acid Equivalent : GAE) ต่อ 1 กรัมสารสกัด พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Endo-cellular product (สกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Exo-cellular product (สกัดจากอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 30.87 mg GAE/g สารสกัด สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 22.28, 12.21 และ 7.23 mg GAE/g สารสกัด ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 26.23 mg GAE/g สารสกัด สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 16.54, 11.74 และ 7.10 mg GAE/g สารสกัด ตามลำดับ (รูปที่ 3.15) จากผลการทดลองปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ

Heleno และคณะ (2012) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใน *Gadoderma lucidum* จากการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนต่างๆของเห็ด เช่น ดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใย พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ปริมาณสูงสุดสกัดได้จากส่วนของดอกเห็ด มีปริมาณเท่ากับ 28.64 mg GAE/g สารสกัด ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากสปอร์ และเส้นใย มีปริมาณเท่ากับ 14.94 และ 14.22 mg GAE/g สารสกัด ตามลำดับ



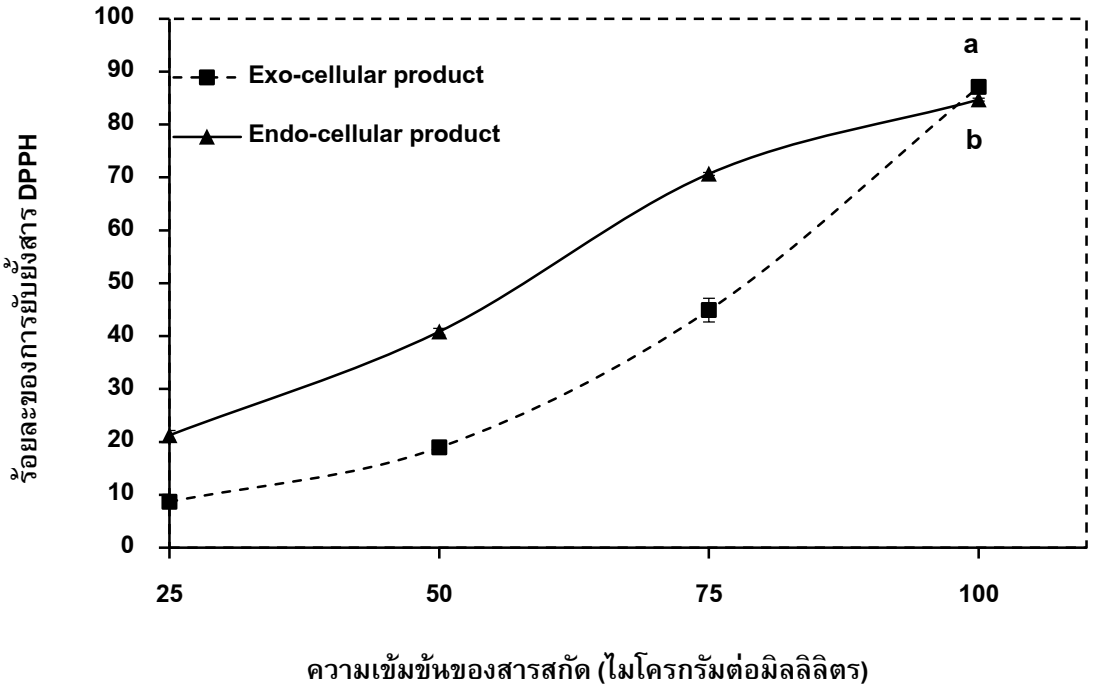
รูปที่ 3.15 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่างๆ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD

2) ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (DPPH assay)

การทดสอบความสามารถของสารสกัดที่ได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสาร BHT (Butylated hydroxy-toluene) พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ใน Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ร้อยละ 84.70 สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ร้อยละ 70.67, 40.84 และ 21.25 ตามลำดับ (รูปที่ 3.16)



รูปที่ 3.16 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่างๆ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD

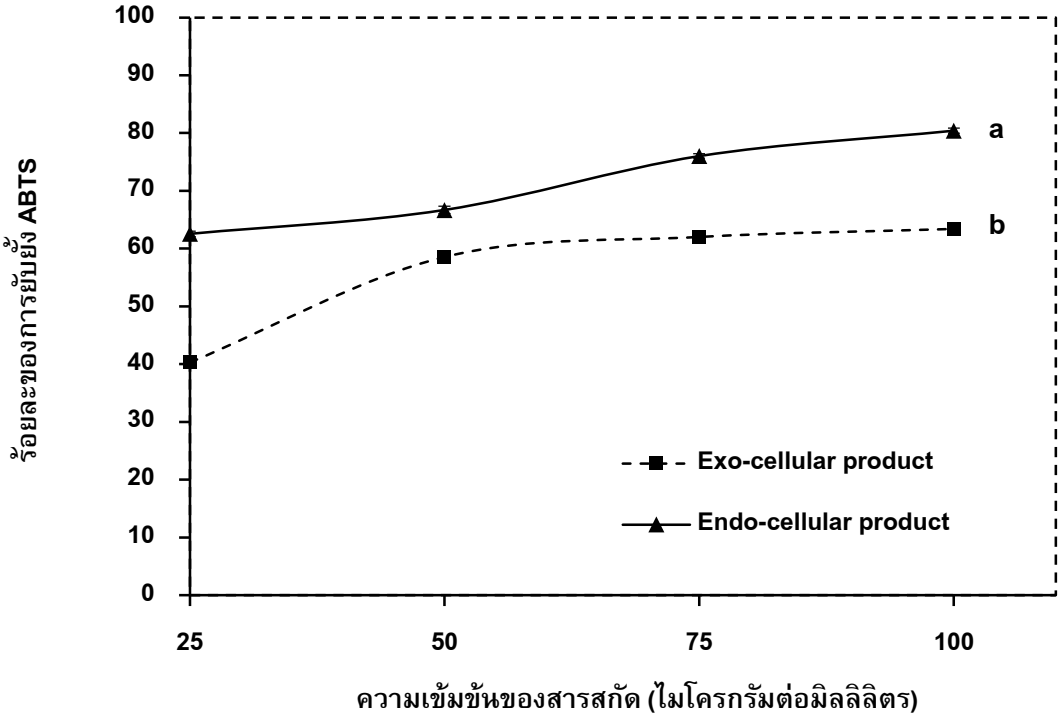
ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ร้อยละ 87.11 สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ร้อยละ 44.90, 18.93 และ 8.64 ตามลำดับ ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ของ *Ganoderma lucidum* จากงานวิจัยของ Chen และคณะ (2014) และ Shi และคณะ (2014) ที่สกัดสารพอลิแซคคาไรด์จาก *Ganoderma lucidum* ด้วยวิธีสกัดแบบ Ultrasonic พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH สูงสุดที่ระดับร้อยละ 53.62 เมื่อสารพอลิแซคคาไรด์มีความเข้มข้น 47.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH สูงสุดที่ระดับร้อยละ 91.48 เมื่อสารพอลิแซคคาไรด์มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการทดลองของ Korzarki และคณะ (2012) ที่สกัดสารพอลิแซคคาไรด์จาก *Ganoderma lucidum* และ *Ganoderma applanatum* พบว่า *Ganoderma*

lucidum มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH สูงสุดที่ระดับร้อยละ 94.8 เมื่อสารพอลิแซคคาไรด์มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Ganoderma applanatum* มีความสามารถในการยับยั้งสาร DPPH ระดับร้อยละ 77.5-81.9 เมื่อสารพอลิแซคคาไรด์มีความเข้มข้น 1.0-10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3) ผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay : (ABTS assay)

การทดสอบความสามารถของสารสกัดที่ได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสาร BHT (Butylated hydroxy-toluene) พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS ร้อยละ 80.41 สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS ร้อยละ 76.01, 66.69 และ 62.55 ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS ร้อยละ 63.38 สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS ร้อยละ 61.99, 58.53 และ 40.28 ตามลำดับ (รูปที่ 3.17) จากงานวิจัยของ Shi และคณะ (2014) สกัดสารพอลิแซคคาไรด์จาก *Ganoderma lucidum* ด้วยวิธี Ultrasonic พบว่า สารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้มีมีความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS มากกว่าร้อยละ 50



รูปที่ 3.17 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งสาร ABTS จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่างๆ

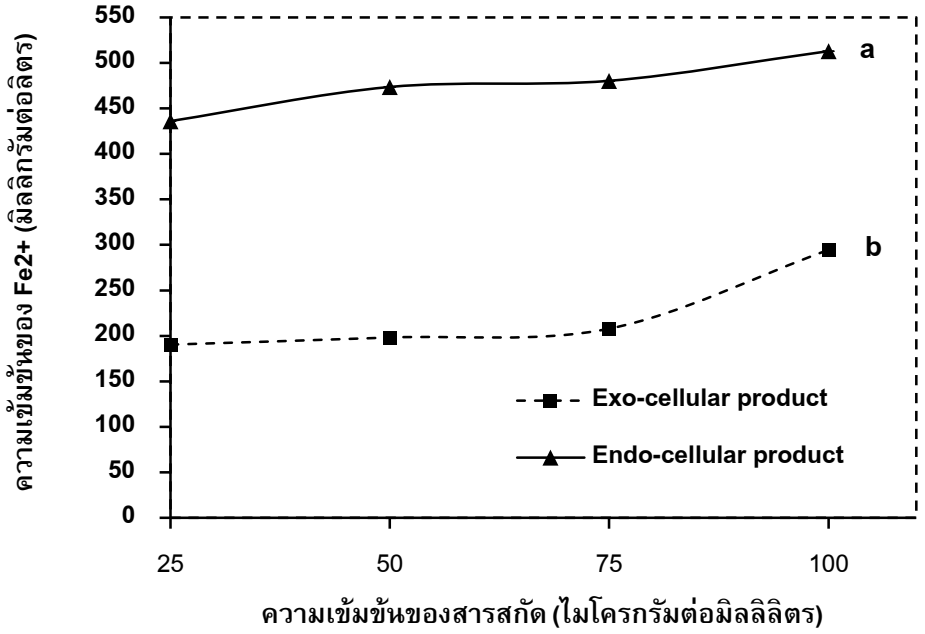
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD ณ.วันที่ 10 ของการทดลอง

4) ผลของการวิเคราะห์วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

การทดสอบความสามารถของสารสกัดที่ได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสมในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านออกซิเดชัน โดยใช้การวัดปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสาร BHT (Butylated hydroxy-toluene) (ตัวอย่างที่มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงจะมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สูงเช่นกัน) พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูป Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Endo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} 512.93 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดที่มีความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} 480.31, 473.57 และ 436.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่อยู่ในรูปของ Exo-cellular product ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} 294.51 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดที่มี

ความเข้มข้น 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} 207.86, 198.11 และ 190.31 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.18) ซึ่งมีความเข้มข้นของ Fe^{2+} น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kozarski และคณะ (2012) ที่สกัดสารพอลิแซคคาไรด์จาก *Ganoderma lucidum* และ *Ganoderma applanatum* พบว่า สารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก *Ganoderma applanatum* มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 3,400 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก *Ganoderma lucidum* ความเข้มข้น 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 5,000-20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปที่ 3.18 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} จากสารที่สกัดได้กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่าง ๆ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ โดยวิธี LSD

จากการทดลองในขั้นตอนนี้จะเห็นได้ว่า Endo-cellular product มีปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และมีปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงกว่า Exo-cellular product จึงทำให้ Endo-cellular product มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า Exo-cellular product การที่ผลิตภัณฑ์สองชนิดนี้มีประสิทธิภาพไม่เท่ากันอาจเนื่องมาจากลักษณะทางโครงสร้างของสาร ß-glucan ที่เกี่ยวข้องกับการสลายพันธะเพื่อปลดปล่อยอิเล็กตรอน ทำให้มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยกลูแคนที่เป็น ß-1,6-glucan โมเลกุลของน้ำตาลจะเชื่อมต่อกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ทำให้เกิดการปลดปล่อยของอิเล็กตรอนได้ยากกว่ากลูแคนที่เป็น ß-1,3-glucan ในส่วนของ Exo-cellular product นั้นอาจมีส่วนประกอบของกลูแคนที่มีลักษณะทางโครงสร้างเป็น

ß-1,6-glucan มากกว่าใน Endo-cellular product ทำให้ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาได้น้อยกว่า ส่งผลให้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้น้อย จึงมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าด้วย (Kagimura *et al*., 2015; Oliveira *et al*., 2015)

3.3.4 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.aureus* ต่อการเกิด Inhibition zone พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสมในรูปของ Exo-cellular product ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.aureus* ได้ ส่วนสารสกัดในรูป Endo-cellular product สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.aureus* ได้ โดยเกิด Inhibition zone ขนาด 0.8 และ 0.7 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3.5) จากการทดลองของ Li และคณะ 2012 ซึ่งสกัด ESAC (Ethanol-soluble acidic components) จาก *Ganoderma atrum* แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *S.aureus, E.coli, B.subtilis* และ *P.vulgaris* พบว่า เกิด Inhibition zone ขนาด 7.87±0.36, 7.53±0.30, 8.09±0.11 และ 6.15±0.45 ตามลำดับ โดยขนาดของ Inhibition zone จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ ESAC ที่เพิ่มขึ้นด้วย

การยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรียเกิดจากสารที่สกัดได้นั้นมีส่วนประกอบของสารประกอบฟีนอล ใน Endo-cellular product มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลมากกว่า Exo-cellular product ทำให้ Endo-cellular product สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้มากกว่า โดยสารประกอบฟีนอลนั้นจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์รั่วไหลออกมา การผ่านเข้าออกของสารในเซลล์ผิดปกติ มีผลทำให้เซลล์ตายได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2554)

ตารางที่ 3.5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ด

ตัวอย่าง	Inhibition zone (เซนติเมตร)	
	E.coli	***S.aureus***
Exo-cellular product	ไม่เกิด Inhibition zone	ไม่เกิด Inhibition zone
Endo-cellular product	0.8	0.7
Control (50% alcohol)	1.1	0.9

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดสมุนไพร

จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างเห็ดสมุนไพรตามแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ได้แก่ สงขลา พัทลุง สตูล และตรัง พบเห็ดหลินจือ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดหลินจือขอบเหลือง เห็ดหลินจือกาละแมดำ เห็ดหลินจือสีแดง และเห็ดหลินจือน้ำตาแดงดำ ซึ่งเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยให้น้ำหนักเส้นใยเท่ากับ 15.670 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร และยังสามารถผลิตสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.23 และ 9.02 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำเส้นใยแห้ง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี ในสภาวะนิ่ง และมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10

4.1.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เมื่อใช้การเตรียมเชื้อเริ่มต้นแบบ Seed inoculum ที่ระยะเวลา 7 วัน เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 40 และอัตราส่วนแร่ธาตุ $CaCl_2$:$MgSO_4$:$ZnCl_2$:$FeSO_4$ เท่ากับ 6:0.5:1:0.06 เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง และมืด เป็นระยะเวลา 16 วัน เห็ดหลินจือขอบเหลืองให้ค่าน้ำหนักเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 2.903 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุด เท่ากับ 0.46 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ

ส่วนที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ให้น้ำหนักเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 2.308 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ และ Endo-*ß*-1,3-glucan สูงสุดเท่ากับ 3.072 และ 37.570 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ให้ปริมาณสารเอกโซพอลิแซคคาไรด์ และ Exo-*ß*-1,3-glucan สูงสุดเท่ากับ 0.540 และ 40.962 มิลลิกรัมต่อกรัมเส้นใยแห้ง ตามลำดับ

4.1.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในสภาวะที่เหมาะสม

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดในรูป Endo-cellular product มีความสมารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดในรูป Exo-cellular product โดยให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 30.87 mg GAE/g สารสกัด ค่าร้อยละต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 87.40 และ 80.41 ตามลำดับ และให้ปริมาณความเข้มข้นของ Fe^{2+} สูงสุดเท่ากับ 0.51 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้สารสกัดในรูป

Endo-cellular product ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* และ *S.aureus* ได้อีกด้วย โดยทำให้เกิด Inhibition zone ขนาด 0.8 และ 0.7 เซนติเมตร ตามลำดับ

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ในการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดสมุนไพรควรพิจารณาถึงช่วงที่เห็ดสามารถเจริญได้ดีที่สุด เพื่อสามารถรวบรวมสายพันธุ์ได้อย่างครบถ้วน และทั่วถึง

4.2.2 เพื่อการผลิตให้ได้ผลผลิตปริมาณมากขึ้น อาจต้องเพิ่มส่วนของสารอาหารอื่นๆ ลงไปในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และลักษณะของสารพอลิแซคคาไรด์ที่ต้องการสามารถเลือกได้จากหลายๆปัจจัย เช่น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนหรืออัตราการเติมอากาศ เป็นต้น เพื่อความสะดวกต่อการผลิต และการสกัด

4.2.3 งานวิจัยนี้เป็นการนำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ที่เป็นของเหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้วยการนำมาเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือทดแทนการใช้อาหารสำเร็จรูป ซึ่งยังมีของเหลือทิ้งชนิดอื่นๆ อีกที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าภายใน. การผลิต การตลาด ปาล์มน้ำมัน ปี 2554. http://agri.dit.go.th. (สืบค้นเมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2555).

กรมควบคุมมลพิษ. ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งที่ระบายออกจากโรงงานอุตสาหกรรม. http://www.pcd.go.th. (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 มิถุนายน 2555).

กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. http://www.moph.go.th/ (สืบค้นเมื่อวันที่ 17 ธันวาคม 2557).

จินตนา แก้วบริสุทธิ์. 2541. การปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยกระบวนการดูดซับในชั้นตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชยันต์ พิเชียรสุนทร. 2541. เห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: นวพลเอ็นเตอร์ไพรส์.

ทนุวงศ์ แสงเทียน. 2552. การศึกษาเห็ดและราในป่าชายเลน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

ธนกฤต พรหมทอง. 2552. การกำจัดสีและสารอินทรีย์ของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มด้วยน้ำหมักชีวภาพและเฟนตันรีเอเจนต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2554. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2553. เห็ดป่าเมืองไทย: ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดยูนิเวอร์แซลกราฟฟิกแอนด์เทรดดิ้ง.

พูนสุข ประเสริฐพรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตบรรเจิดกุล และ อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้ง และคุณลักษณะของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วารสารสงขลานครินทร์. 12: 169-176.

ลือชา วนรัตน์, อำนาจ เดชะ, ธีรยุทธ อินต๊ะเสน, และ บุญใจ ลิ่มศิลา. 2553. คู่มือการผลิตเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือตามแนวทางเกษตรดีที่เหมาะสม. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์ องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.

วสันณ์ เพชรรัตน์.2536. การผลิตเห็ด. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช.คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภศิษฏ์ อรุณรุ่งสวัสดิ์. 2552. ชีวเคมีพื้นฐาน. กรุงเทพฯ: ท้อป.

ศูนย์รวมข้อมูลสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย. ข้อมูลสิ่งมีชีวิต. http://www.thaibiodiversity.org (สืบค้นเมื่อวันที่ 21 กรกฎาคม 2555).

สาธิต ไทยทัตกุล. 2539. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: ฟ้าอภัย.

สำนักงานความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ กรมป่าไม้. เห็ดรา. http://biodiversity.forest.go.th (สืบค้นเมื่อวันที่ 21 กรกฎาคม 2555).

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. ปาล์มน้ำมันขาดแคลนหรือไม่ โดย ศูนย์สารสนเทศยุทธศาสตร์ภาครัฐ. http://service.nic.go.th. (สืบค้นเมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม 2555).

สุรพล รักประทุม และ ชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง. 2539. เห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: ที.พี.พริ้นท์.

สุวิทย์ สุวรรณโณ และ ไชนะ มูเล็ง. 2555. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเส้นใย และสารพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตภายในเซลล์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) โดยสภาวะของสารอาหารที่เหมาะสม. **วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม**. 31(4): 336-343.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2541. เห็ดเมืองไทย. ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

อานนท์ เอื้อตระกูล. 2541. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ: ฟ้าอภัย.

(POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 42: 1260-1278.

A.O.A.C International. 2005. Official Methods of Analysis Of AOAC International (18thed.), Methods 925.08. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Maryland USA.

Agamuthu, P. 1994. Composting of goat dung with various additives for improved fertilizwe capacity. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 10: 194-198.

Ahmad, A. L., Ismail, S., and Bhatia, S. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. **Desalination**. 157: 87-95.

Ahmed, Y., Yaakob, Z., Akhtar, P., and Sopian, K. 2015. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment process in palm oil mill effluent

Alam, M. Z., Ameem, E. S., Muyibi, S. A., and Kabbashi, N. A. 2009. The factor affecting the performance of activated carbon prepared from oil palm empty fruit bunches for adsorption of Phenols. **Chemical Engineering Journal**. 155: 191-198.

Alam, M. Z., Karim, M. I. A., Hamisan, A. F., Jamal, P., and Jalal, K.C. A. 2006. Liquid state bioconversion of palm oil mill effluent for cellulose production: statistical optimization of process conditions. International conference on Natural Resources Engineering and Technology: 226-232.

Alexopoulos, C. J., Mims. C. W., and Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. 4th ed. New York: John Wiley and sons.

Amadi, O. C., and Moneke, A. N. 2012. Use of starch containing tubers for the formulation of culture media for fungal cultivation. **African Journal of Microbiology Research**. 6(21): 4527-4532.

Amelia, L., Wahab, D. A., and Hassan, A. 2009. Modelling of palm oil production using fuzzy expert system. **Expert Systems with Applications**. 36: 8735-8749.

Anong, C., Poonpilai, S., Uthaiwan, S., Saisamorn, L., Ahchara, P., Niwat, S., Charida, P., Vasan, P., Uraporn, S., Kittima, D., Usa, K., Sutheera, T., and Sulichet, T. 2011. Checklist of Mushroom (basidiomycetes) in Thailand. ONEP Biodiversity series. 20: 255-261.

Aoki, S. K., and Jongjeen, J. 2009. Study of a modified for cellulolytic fubgi isolated from soil. **Agricultural Science Journal**. 40: 425-428.

APHA, AWWA and WEF. 2005. "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater". American Public Heaith Association, American Water Work Association and Water Environment Federation (21thed.). Washington DC., USA.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Truck, M. 1966. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". **American Jourmal of Clinical Pathology**. 45: 493-496.

Berovic, M., Habijanic, J., Zore, I., Wraber, B., Hodzar, D., Boh, B., and Pohleven, F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**. 103: 77-86.

Bohn, J.A., and Bemiller, J. N. 1995. (1-3)-*ß*-D-Glucans as biological response modifier: a review of structure functional activity relationship. **Carbohydrate Polymers**. 28: 3-14.

Bollag, J. M., Shuttleworth, K. I., and Anderson, D. H. 1988. Laccase-mediated detoxification of Phenolsic compounds. **Applied Environmental Microbiology**. P. 3086-3091.

Brown, G. D., and Gordon, S. 2005. Immune recognition of fungal *ß*-glucans. **Cellular Microbiology**. 7: 471–479.

Bunrung, S., Prasertsan, S., and Prasertsan, P. Decolorization of biogas effluent from palm oil mill using combined biological and physical methods. 2014. **Kasetsart Journal**. 48: 95-104.

Chan, K. W., Watson, I., and Lim, K. C. 1980. Use of oil palm waste material for increase production. **Soil science and Agricultural development**. 213-42.

Chang, M. Y., Tsai, G. J., and Houng, J. Y. 2006. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. **Enzyme and Microbial Technology**. 38: 407-414.

Chapman, G. W., and Horvat, R. J. 1989. Determination of nonvolatile acid and sugar from fruits and sweet potato extracts by capillary GLC and GLC/MS. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. 37: 947-950.

Chen, T. Q., Wu, Y. B., Wu, J. G., Ma, L., Dong, Z. H., and Wu, J. Z. 2014. Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (LingZhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 45: 57-62.

Cheung, P. C. K. 1996. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutrition Research**. 16: 1953-1957.

Chirinang P. and Intarapichet K. O. 2009. Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. **Sciene Asia Journal**. 35: 326-331.

Cui, Y. H., and Zhang, K. C. 2011. Effect of metal ions on the growth and metabolites production of *Ganoderma lucidum* in submerged culture. **African Journal of Biotechnology**. 10(56): 11983-11989.

Daba, A. S., and Ezeronye, O. U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushroom. **African Journal of Biotechnology**. 2(12): 672-678.

Daniel, S. 2003. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. **Integrative Cancer Therapies**. 2(4): 358-364.

Devendra, M. T. 2004. Integrated tree crops-ruminants systems-potential importance of the oil palm. **Outlook Agricultural**. 33: 157-66.

Dubois, M., Gilles, K.A.,Hamilton, J.K.,Rebers, P.A., and Smith,F.1956.Colometric method for determination of sugar and related substance. **Analytical Biochemistry**. 28:350-356

Elisashvili, V. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushroom: Bioprocesses and products (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 14(3): 211-239.

Elmastas, M. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Compossition and Analysis**. 337-345.

Fang, Q. H., and Zhong, J. J. 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology Progress.** 18(1): 51-54.

Fang, Q. H., Tang, Y. J., and Zhong, J. J. 1999. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**. 37: 1375-1379.

Gao Y. H, Sai X. H, Chen G. L, Ye J. X, and Zhou S. F. 2003. A randomized, placebo-controlled, multi-center study of Ganoderma lucidum (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) polysaccharides (Ganopoly) in patients with advanced lung cancer. International Journal Medicinal Mushrooms. 5: 368–81.

Habib, M. A. B., Yusoff, F. M., Phang, S. M., Ang, K. J., and Mohamed, S. 1997. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. **Aquaculture**. 158: 182-188.

Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**. 46(5): 531-542.

Harada, T., Miura, N. N., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T., and Ohno, N. 2002. IFN-gamma induction by SCG, 1,3- *ß* -D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. 22: 1227–1239.

Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Buelga, C. S., Ferreira, I. C. F. R. 2012. Fruiting body, spores and *in vitro* produrced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of Phenolsic and polysaccharidic extracts. **Food Research International.** 46: 135-140.

Hippe, H., Andreesen, J. R., and Gottschalk, G. 1991. The Genus *Clostridium* Nonmedical in The Prokaryotes, 2nd ed. New York: Springer. pp: 1800─1866.

Ho, C. C., Tan, Y. K., and Wang C. W. 1984. The distribution of chemical constituents between the soluble and the particulate fraction of palm oil mill effluent and its significance on its utilization/treatment. **Journal of Agricultural Wastes**. 11: 61-71.

Hsieh, C., Tseng, M. H., and Liu, C. J. 2005. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. **Enzyme and Microbial Technology**. 38: 109-117.

Hutagalung, R. I., Chang, C. C., Toh, K. M., and Chan, H. C. 1977. Potential of palm oil mill effluent as feed for growing-finishing pigs. **Planter**. 53: 2-9.

Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. **International Journal Medicinal Mushrooms**. 3: 291–298.

Jamal, P. Alam, M. Z., Ramlan, M., Salleh, M., and Nadzir, M. M. 2005. Screening of Aspergillus for citric acid production from palm oil mill effluent. **Journal of Biotechnology**. 4(4): 275-278.

Kagimura, F. Y., Cunha, M. A. A., Theis, T. V., Malfatti, C. R. M., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Teixeira, S. D., and Salome, K. 2015. Carboxymethylation of (1-6)-*ß*- glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**. 127:390-399.

Kim, H. M., Kim, S. W., Hwang, H. J., Park, M. K., Mahmoud. Y. A. G., Choi, J. W., and Yun, J. W. 2006. Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma resinaceum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 16(8): 1240-1247.

Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwnag, H. J., Choi, J. W., and Yun, J. W. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindacae*. **Bioresource Technology.** 96: 1175-1182.

Ko, Y-T., and Lin, Y-L. 2004. 1,3- *ß* -glucan Quantification by fluorescence microassay and analysis of its distribution in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 3313-3318.

Kozorski, M., Klaus, A., Niksic, M., Vrvic, M. M., Todorovic, N., Jakovljevic, D., and Griensven, L. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushroom *Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. **Journal of Food Composition and Analysis**. 26: 144-153.

Kumon, H., Tomoshika, K., Matunaga, T., Ogawa, M., and Ohmori, H. A. 1994. Sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. **Microbiology Immunology**. 38: 615-619.

Lam, M. K., and Lee, K. T. 2011. Remewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**. 29: 124-141.

Lama, L., Nicolaus, B., Calandrell, V., Manca, M. C., Romano, I., and Gambacorta, A. 1999. Effect of growth conditions on endo- and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrical* 10C. **Phytochemistry**. 42: 655-659.

Lee, K. M., Lee, S. Y., and Lee, H. Y. 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal Bioscience and Bioengineering**. 88: 646–50.

Lee, W. Y., Park, Y. K., Ahn, J. K., Ka, K. H., and Park, S. Y. 2007. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applatum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 40: 249-254.

Li, W. J., Nie, S. P., Liu, X. Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., and Xie, M. Y. 2012. Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic componentsnfrom *Ganoderma atrum*. **Food and Chemical Toxicology**. 50: 689-694.

Liew, W. L., Kassim, M. A., Muda, K., Loh, S. K., and Affam, A. C. 2015. Conventional methods and emerging wastewater polishing technologies for palm oil mill effluent treatment: A review. **Journal of Environmental Management**. 149: 222- 235.

Liu, G. Q., and Zhang, K. C. 2005. Mechanisms of the anticancer action of Ganoderma lucidum (Leyss.ex Fr.) Karst.: A new understanding. **Journal of Intigrative Plant Biology**. 47: 129-135.

Liu, Y. J., Du, J. L., Cao, L. P., Jia, R., Shen, Y. J., Zhao, C. Y., Xu, P., and Yin, G. J. 2015. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **International Immunopharmacology.** 25: 112-120.

Lo, H. C., Tsai, F. A., Wasser, S. P., Yang, J. G., and Huang, B. M. 2006. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide

glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. **Life Science**. 78: 1957–1966.

Madaki, Y. S., and Seng, L. 2013. Palm oil mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: waste or resource. **International Journal of Science, Evironment and Technology**. 2(6): 1138-1155.

Manzi, P., and Pizzoferrato, L. 2000. Beta-glucan inedible mushroom. **Food Chemistry.** 68: 315-318.

Mau J. L, Lin H. C, and Chen C. C. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International. 34: 521–526.

Mayell, M. 2001. Maitake extracts and their therapeutic potential. **Alternative Medicine Review**. 6: 48–60.

Munz, C., Steinman, R. M., and Fujii S. 2005. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. **Journal of Experimental Medicine**. 202: 203–207.

Mursito, B., Jenie, U. A., Mubarika, S., Kardono, L. B. S. 2010. Isolation of *ß*-(1-3) Glucan Compound from the Water Extract of Indonesian Jamur Tanduk *(Termitomyces eurirrhizus Berk*). **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 13: 847-851

Nguyen, V. T., Tung, N. T., Cuong, T. D., Hung, T. M., Kim, J. A., Woo, M. H., Choi, J. S., Lee, J. H., and Min B. S. 2015. Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from Ganoderma lucidum. **Phytochemistry Letters**. 12: 69-74.

Oliveira, K. S. M., Bastiani, M. D., Cordeiro, L. M. C., Costa, M. F., Teledo, K. A., Lacomini, M., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., and Nascimento, V. M. G. 2015. (1-6)- and (1-3)(1-6)-*ß*-glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**. 133:539-546.

O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., and Angelidaki, I. 2008. Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. **International Jounal of Hydrogen Energy**. 33: 1204-1214.

Oviasogie, P. O., and Aghimien, A. E. 2003. Macronutrient status and speciation of Cu, Fe, Zn, and Pb in soil containing palm pil mill effluent. **Global Journal Pure Applied Science**. 9: 71-80.

Papinutti, L. 2010. Effect of nutrient, pH and water potential on exopolysaccharide production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. **Bioresource Technology**. 101: 1941-1946.

Perumal, K. 2009. Indigenous technology on organic cultivation of Reishi. Shri AMM Murugappa Chettiar Research Center.

Rasdi, Z., Rahman, N. A. A., Aziz, S. A., Yee, P. L., Yusoff, M. Z. M., Ling, C. M., and Hassan, M. A. 2009. Statistical optimization of biohydrogen production from palm oil mill effluent by natural microflora. **Journal of Biotechnology**. 3: 79-86.

Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., and Tarloy, M. 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. **Journal of Functional Foods**. 4:687-709.

Sarma, A. D., Mallick, A. R. and Ghosh, A. K. 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**. 1(3): 185-192.

Sharma, V. K., Canditelli, M., Fortona, F. and Cornacchia, G. 1997. Processsing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: Review. **Energy Conversion and Management**. 38(5): 453-478.

Shi, M., Yang, Y., Hu, X., and Zhang, Z. 2014. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. **Food Chemistry**. 155: 50-56.

Silva, D. 2003. Ganoderma lucidum (Reishi) in cancer treatment. **Integrative cancer Therapies**. 2(4): 358-364.

Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushroom. Speed Press. Berkeley, California. USA. Pp. 574.

Suwanno, S. 2007. Effect of light on mycelium growthof *Ganoderma lucidum Karst*. Doctoral Dissertation. Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Japan. Pp. 133.

Suwanno, S., Nakamura, K., Amano, Y., Shida, M., and Horiuchi, I. 2005. Development of the method for efficient disruption and rapid extraction on the *ß* -1,3-glucan determination from the mycelia of Ganoderma lucidum. **Japanese Society of Mushroom Science and Biotechology**. 13: 83-93.

Tang, Y. J. and Zhong, J. J. 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 20-28.

Tang, Y. J. and Zhong, J. J. 2003. Role of oxygen in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**. 32: 478-484.

Tchobanoglous, G.,Thesisen, H., and Vilal, S. 1993.Integrated solid waste management engineering principle and management Issues. Mcgraw-Hill, Inc. p. 987.

Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite,I., Nakajima, M., and Sunairi, M. 2006. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produce by a benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus sp.* 33. **Carbohydrate Research**. 341(5): 616-623.

Veena, S. S., and Pandey, M. 2011. Paddy straw as a substrate for the cultivation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, Ganoderma lucidum (W.Curt.:Fr.) P. Karst. In india. **Journal of medicinal mushrooms**. 13(4): 397-400.

Vetvicka, V., and Yvin, J. C. 2004. Effects of marine *ß* -1,3 glucan on immune reactions. **International Immunopharmacology**. 4: 721–730.

Vichitphan, S., Vichitphan., K., and Sirikhansaeng, P. 2007. Flavonoid content and antioxidant activity of Krachai-dun (Kaempferia parviflora) wine. **KMITL Science and Technology**. 7: 97-105.

Wagner, R., Mitchell, D. A., Sasaki, G. L., Amazonas, M. A. L. A., and Berovic, M. 2003. Current techniques for the cultivation of Ganoderma lucidum for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. **Food Technology and Biotechnology**. 41: 371-382.

Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yan, Z. 2015. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. **International Journal of Biological Macromolecules**. 74: 119-126.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomudulating polysaccharides**. Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 258-274.

Wood, B. J., Pillai, K. R., and Rajaratnam, J. A. 1979 Palm oil mill effluent disposal on land. **Agricultural wastes**. 1: 103-127.

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J.Md., and Anuar, N. 2007. Palm oil mill effluent (POME) treatment and bioresources recovery using ultrafiltration membrane: Effect of pressure on membrane fouling. **Biochemical Engineering Journal**. 35: 309-317.

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J.Md., and Anuar, N. 2009. A holistic approach to managing palm oil mill effluent (POME): Biotechnological advances in the sustainable reuse of POME. **Biotechnology Advances**. 27: 40-52.

Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Jahim, J.Md., and Anuar, N. 2010. Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end-of-pipe processes. **Journal of Environmental Management**. 91: 1467-1490.

Xu, P., Ding, Z., Qian, Z., Zhao, C., and Zhang, K. 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 325-331.

Yang, F. C., and Liau, C. B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. **Process Biochemistry**. *33*: 547-553.

Yang, F. C., Ke, Y. F., and Kuo, S. S. 2000. Effect of fatty acid on the mycelia growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. 27: 295-301.

Yeong, S. W., and Azizah, A. 1987 Effect of processing on feeding values of palm oil mill effluent (POME) in non-ruminants. Society of Animal Production. 302-306.

Yuan, B., Chi, X., and Zhang, R. 2012. Optimization of exopolysaccharides production from a novel strain of *Ganoderma lucidum* CAU5501 in submerged culture. **Brazilian Journal of Microbiology**. 490-497.

Zabka, M. and Pavela, R. 2013. Antifungal efficacy of some natural Phenolsic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**. 93: 1051-1056.

Zha, X. Q., Luo, J. P., Jiang, S. T., and Wan, J. U. 2007. Enhancement of polysaccharide production in suspension culture of protocorm-like bodies from Dedrobium huoshanense by optimization of medium composition and feeding of sucrose. **Process Biochemistry**. 42: 344-351.

Zhang, H. N., and Lin, Z. B. 2004. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Acta Pharmacologica Sinica**. 25(2): 191-195.

ภาคผนวก ก
วิธีเตรียมสารเคมี และวิธีวิเคราะห์

ก.1 สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sweet Potato Dextrose Broth (SPDB)

(สุวิทย์ และไชนะ, 2555)

มันเทศ (Sweet potato)	250 กรัม
เพปโตน (Peptone)	1 กรัม
วิตามินบีหก (Pyridoxine)	0.5 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($Cacl_2$)	1.3 กรัม
น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	20 กรัม

ต้มมันเทศ 250 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กรองเอาส่วนเนื้อของมันเทศออก น้ำที่ได้นำมาเติมเพปโตน 1 กรัม วิตามินบีหก 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร ก่อนใช้นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารเอนโดพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric (Dubois *et al.,* 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 95
2. สารละลายฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 เตรียมโดยละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลายกลูโคส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

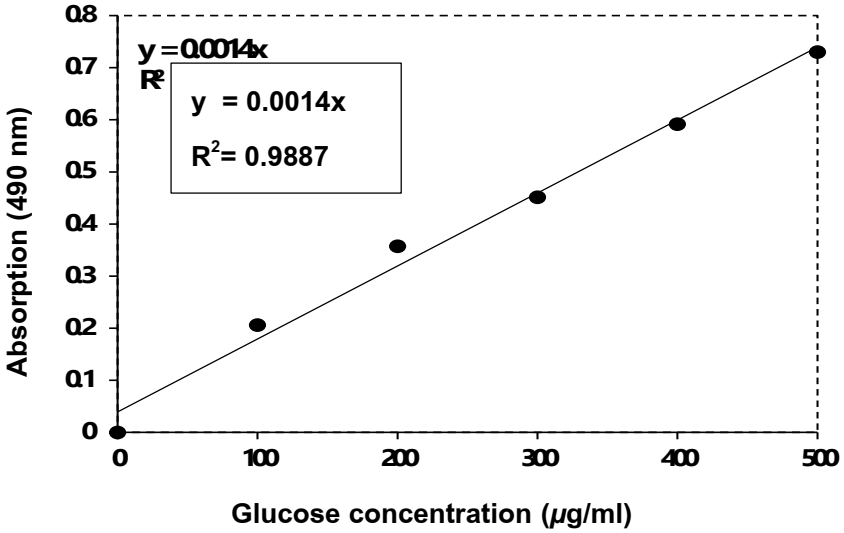
1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ก.1
2. ปิเปตตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกลูโคส 200ไมโครลิตร ลงในขวดสีชา
3. เติมสารละลายฟีนอล (ร้อยละ 5) ลงไป 100 ไมโครลิตร
3. เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงไป 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{490\ nm}$ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ตารางภาคผนวกที่ ก.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5.0
100	0.5	4.5
200	1.0	4.0
300	1.5	3.5
400	2.0	3.0
500	2.5	2.5

ตารางภาคผนวกที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

Glucose concentration (µg/ml)	Absorption (490 nm)	Absorption-Blank
0	0.5974	0
100	0.8036	0.2062
200	0.9548	0.3574
300	1.0490	0.4516
400	1.1893	0.5919
500	1.3278	0.7304



รูปภาคผนวกที่ ก.1 กราฟมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric

ก.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสาร Endo-ß-1,3-glucan ด้วยวิธีวิเคราะห์ Aniline blue

(ดัดแปลงจาก Suwanno, *et al.,* 2005)

สารเคมี

1. Aniline blue (ร้อยละ 0.1) เตรียมโดยละลาย Aniline blue 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 1 โมลาร์ เตรียมโดยตวง HCl (ความเข้มข้นร้อยละ 37) ปริมาตร 82.92 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3. NaOH Glycin buffer เตรียมโดยละลาย Glycin 150.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 9.5 ด้วย NaOH 2 โมลาร์

4. Total Fluorescence ผสมสารเคมีที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน Aniline blue (ร้อยละ 0.1): (HCl) 1 โมลาร์: NaOH Glycin buffer เท่ากับ 40: 21: 59 มิลลิลิตร

5. Auto Fluorescence ผสมสารเคมีที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน น้ำกลั่น: (HCl) 1 โมลาร์: NaOH Glycin buffer เท่ากับ 40: 21: 59 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. เตรียม Stock solution ของ ß-1,3-glucan โดยละลาย ß-1,3-glucan 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่างๆ (0-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตารางภาคผนวกที่ ก.3

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นจาก Stock solution 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองโดยแยกเป็น 2 ชุด คือ Total Fluorescence และ Auto Fluorescence

3. เติม NaOH (1 โมลาร์) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 ชุด เขย่าให้เข้ากัน

4. เติมสารละลาย Total Fluorescence และ Auto Fluorescence ในหลอดทดลอง 4.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อน (Water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6. นำไปวัดค่า Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น Excitation 393 นาโนเมตร และ Emission 479 นาโนเมตร

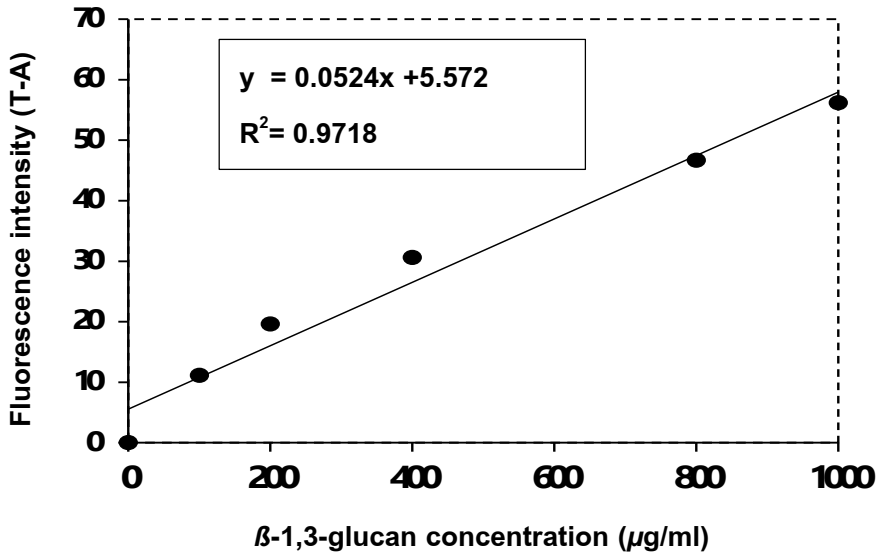
Fluorescence inrensity = Total Fluorescence - Auto Fluorescence

ตารางภาคผนวกที่ ก.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *ß*-1,3-glucan ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน *ß*-1,3-glucan (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตร NaOH (1 โมลาร์) (มิลลิลิตร)
0	0	5.0
100	0.5	4.5
200	1.0	4.0
400	2.0	3.0
800	4.0	1.0
1,000	5.0	0

ตารางภาคผนวกที่ ก.4 ค่า Fluorescence intensity ของสารละลายมาตรฐาน *ß*-1,3-glucan ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ß-1,3-glucan concentration (µg/ml)	Total fluorescence	Total fluorescence-Blank	Auto fluorescence	Auto fluorescence-Blank	Fluorescence intensity (T-A)
0	1.5021	0	0.9988	0	0
100	12.9003	11.3982	1.2552	0.2564	11.1418
200	21.7024	20.2003	1.5895	0.5907	19.6096
400	33.1772	31.6751	2.0633	1.0645	30.6106
800	49.3545	47.8524	2.1732	1.1744	46.6780
1000	58.9022	57.4001	2.2296	1.2308	56.1693



รูปภาคผนวกที่ ก.2 กราฟมาตรฐาน *ß*-1,3-glucan วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue

ภาคผนวก ข

วิธีเตรียมสารเคมี และวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ

ข.1 วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolsic contents) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลาย Gallic acid 0.1 กรัม ในเมทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. เตรียม Folin-Cciocalteau 5 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1)

3. เตรียม Na_2CO_3 2 กรัม ละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายสารสกัดที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือ 0.01 กรัม ด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Stock solution (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข.1

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
25	0.25	0.75
50	0.50	0.50
75	0.75	0.25
100	1.00	0

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างสารที่สกัดได้ความเข้มข้นร้อยละ 25-100 และสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตร

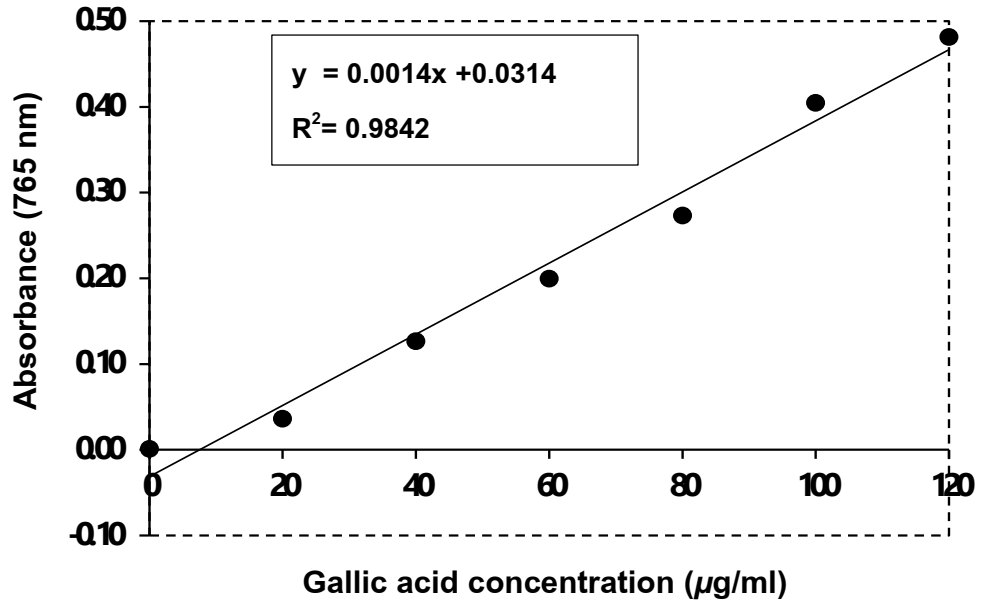
2. เติมสารละลาย Na_2CO_3 2 มิลลิลิตร ในตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3. เติม Folin-Ciocalteau 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{765\ nm}$ ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

ตารางภาคผนวกที่ ข.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ Gallic acid (µg/ml)	Absorbance (765 nm)
0	0.0012
20	0.0364
40	0.1266
60	0.1997
80	0.2731
100	0.4048
120	0.4814



รูปภาคผนวกที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

ข.2 วิธีการวิเคราะห์ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH assay) ตามวิธีของ Elmastas และคณะ (2007)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารละลาย BHT 0.01 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปิเปตใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียม 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 0.1 มิลลิโมล โดยชั่งสาร 0.0039 กรัม ละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายสารสกัดที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือ 0.01 กรัม ด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Stock solution (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข.3

ตารางภาคผนวก ข.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (DPPH assay)

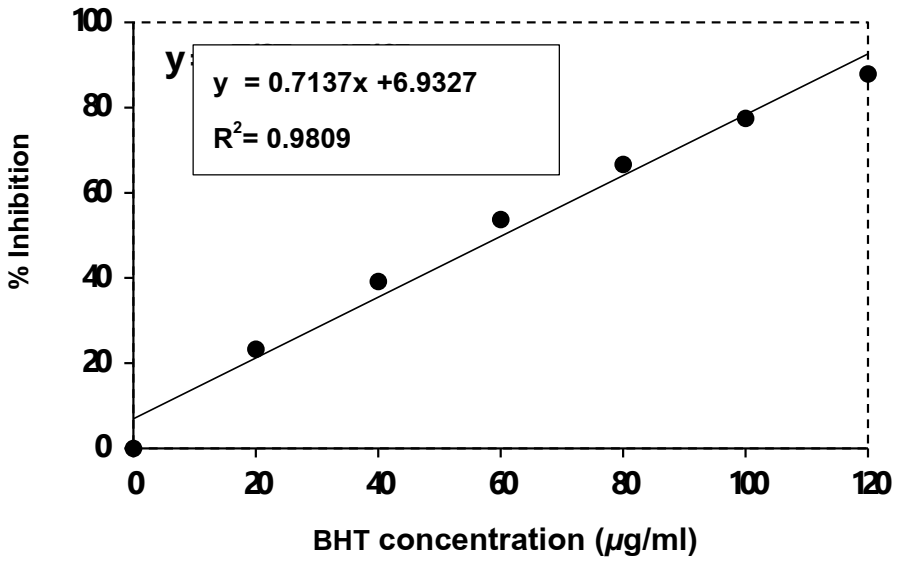
ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
25	0.75	2.25
50	1.50	1.50
75	2.25	0.75
100	3.00	0

วิธีการ

1. เติมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 3 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
3. วัดค่าการดูดดกลืนแสงที่ $A_{517\ nm}$ ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

ตารางภาคผนวกที่ ข.4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ BHT (µg/ml)	Absorbance (517 nm)	% Remaining	% Inhibition
0	0.6898	0.00	0.00
20	0.5292	76.72	23.28
40	0.4195	60.81	39.19
60	0.3191	46.26	53.74
80	0.2300	33.34	66.66
100	0.1552	22.50	77.50
120	0.0833	12.08	87.92



รูปภาคผนวกที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT

ข.3 วิธีการวิเคราะห์ 2, 2'- Azino - bis (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulfonic acid) cation radical scavenging assay (ABTS assay) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารละลาย BHT 0.01 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปิเปตใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมล โดยการชั่งสาร ABTS 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปิเปตใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

3. เตรียม $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมล โดย ชั่งสาร 0.0066 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปิเปตใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

4. เตรียม ABTS Stock solution โดย ผสม ABTS 7 มิลลิโมล กับ $K_2S_2O_8$ 2.45 มิลลิโมล อัตราส่วน 1:0.5 แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดสีชาได้ 2-3 วัน

5. เตรียม ABTS Working solution โดย เจือจาง ABTS Stock solution ด้วยน้ำ DI ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.7-0.9 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายสารสกัดที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือ 0.01 กรัม ด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Stock solution (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข.5

ตารางภาคผนวกที่ ข.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
25	0.25	0.75
50	0.50	0.50
75	0.75	0.25
100	1.00	0

วิธีการ

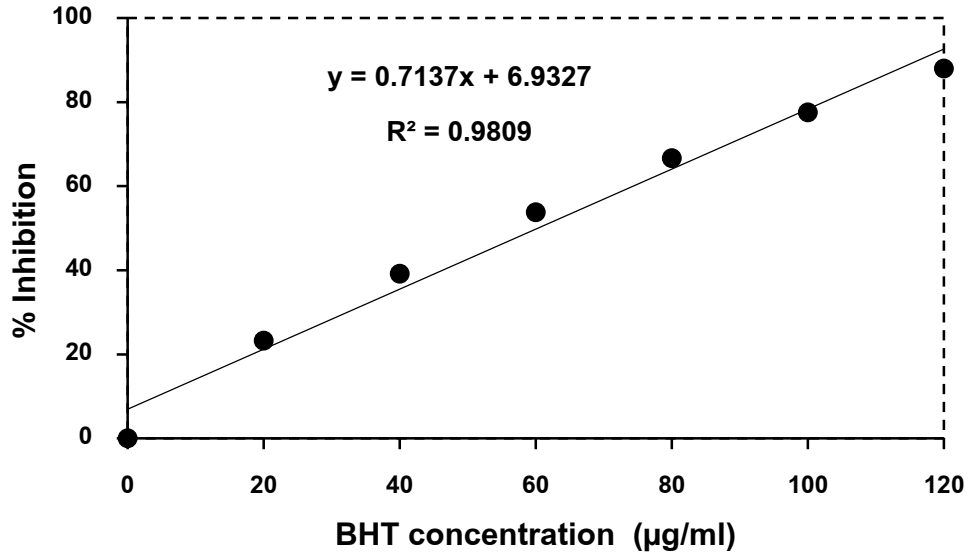
1. เตรียมตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน BTH ความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เติมสาร ABTS Working solution 2 มิลลิลิตร ในแต่ละตัวอย่าง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที

3. วัดค่าการดูดดกลืนแสงที่ $A_{734\ nm}$ ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

ตารางภาคผนวกที่ ข.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ BHT (µg/ml)	Absorbance (734 nm)	% Remaining	% Inhibition
0	0.7992	0.00	0.00
20	0.5917	74.04	25.96
40	0.4259	53.29	46.71
60	0.3390	42.42	57.58
80	0.2826	35.36	64.64
100	0.1978	24.75	75.25
120	0.1489	18.63	81.37



รูปภาคผนวกที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT

ข.4 วิธีการวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) ตามวิธีของ Chirinang และ Intarapichet (2009)

สารเคมี

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารละลาย BHT 0.01 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปิเปตใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียม Acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมล pH 3.6 โดย ชั่ง CH_3COONa 1.5 กรัมละลายในกรดแอซีติก 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วนน้ำ DI ให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3. เตรียม $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล โดย ชั่ง $FeCl_3$ 0.054 กรัม ละลายด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

4. เตรียม TPTZ โดย ชั่ง TPTZ 0.0312 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมล ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

5. เตรียมสารละลาย FRAP โดย ผสม Acetate buffer:$FeCl_3$:TPTZ ในอัตราส่วน 20:2:2 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ละลายสารสกัดที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหลินจือ 0.01 กรัม ด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Stock solution (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดังตารางภาคผนวกที่ ข.7

ตารางภาคผนวกที่ ข.7 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตร Stock solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
25	0.25	0.75
50	0.50	0.50
75	0.75	0.25
100	1.00	0

วิธีการ

1. นำสารละลาย FRAP บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 8 นาที ปิเปต 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

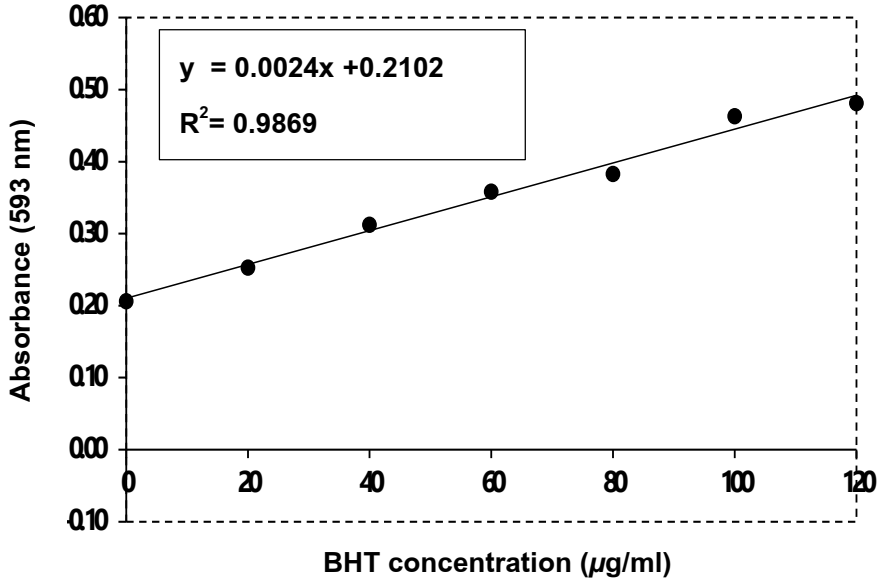
2. เติมน้ำ DI 150 ไมโครลิตร

3. เติมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน BHT 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4. วัดค่าการดูดดกลืนแสงที่ $A_{593\ nm}$ ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer

ตารางภาคผนวกที่ ข.8 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน BTH ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ความเข้มข้นของ BHT (µg/ml)	Absorbance (593 nm)
0	0.2063
20	0.2530
40	0.3126
60	0.3586
80	0.3831
100	0.4631
120	0.4814



รูปภาคผนวกที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BHT

ภาคผนวก ค
บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (Proceeding)

รัชฎาพร ศิริรัตน์ และสุวิทย์ สุวรรณโณ. 2558. ความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 วันที่ 3-6 กุมภาพันธ์ 2558. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Growth of *Ganoderma calidophilum* mycelia in palm oil mill effluent

รัชฎาพร ศิริรัตน์[1*], สุวิทย์ สุวรรณโณ[1]

Radchadaporn Sirirad[1*], Suvit Suwanno[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโต การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลือง (*Ganoderma calidophilum*) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ค่าพีเอช 7.93 ซีโอดี 7,286.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมด 11,720 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งแขวนลอยทั้งหมด 1,900 มิลลิกรัมต่อลิตร คาร์โบไฮเดรต 4.30 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน 436.66 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 14.96 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 280.10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ เหล็ก 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตร การเตรียมเชื้อเริ่มต้นใช้เทคนิค Seed inoculum ด้วยการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวเอสพีดีบีบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ใช้ Seed inoculum ร้อยละ 7 โดยปริมาตรเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน พบว่าเชื้อให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 1.2 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคน 330 และ 148.12 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามลำดับ

ABSTRACT

The objective of this research was to study mycelium growth, polysaccharide and ß-glucan production of *Ganoderma calidophilum* cultivated in palm oil mill effluent. The palm oil mill effluent had the chemical characteristics including pH 7.93, Chemical Oxygen Demand 7,286.4 mg/l, Total Dissolve Solid 11,720 mg/l, Total Suspended Solid 1,900 mg/l, Carbohydrate 4.30 mg/l, Total Kjeldahl Nitrogen 436 .66 mg/l, Total Phosphorus 14.96 mg/l, Total Potassium 280.10 mg/l and Iron 0.93 mg/l. The initial inoculum was prepared by seed inoculum technique. The technique was done by cultivation the mycelium in Sweet Potato Dextrose Broth (SPDB) and placed on a rotary shaker (120 rpm) at room temperature for 7 days. The 7 % by volume of seed inoculum was cultivated in palm oil mill effluent which adjusted initial pH to 6. The culture was incubated in a static condition at room temperature for 16 days. It was found that the cultivation method gave maximum mycelium dry weight at 1.2 g/l and polysaccharide and ß-glucan contents at 330 and 148.12 µg/g, respectively.

Key Words: *Ganoderma calidophilum*, palm oil mill effluent, polysaccharide, ß -glucan

[*]Corresponding Author; E-mail address: **Hidemisou@gmail.com**

[1]คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

[1]Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University, Songkhla 90112.

คำนำ

ในกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มต้องใช้น้ำเป็นปริมาณมาก และปริมาณน้ำมากกว่าร้อยละ 50 ของน้ำที่ใช้ในกระบวนการสกัดจะกลายเป็นน้ำทิ้ง (Ahmad *et al*., 2003) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบว่าในน้ำทิ้งมีปริมาณของสารอินทรีย์สูง ทั้งโปรตีน ไขมัน สารประกอบไนโตรเจน และแร่ธาตุ (Ho *et al*., 1984) จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างแพร่หลาย เช่น การนำไปใช้เป็นปุ๋ย การนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ การนำไปใช้เป็นแหล่งอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นก๊าซชีวภาพ กรดอินทรีย์ เอนไซม์ สารกำจัดแมลง (Wu *et al*., 2007) ดังนั้นน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจึงน่าจะเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเช่นเดียวกัน โดยปกติแล้วเห็ดหลินจือจะพบได้น้อยมากตามธรรมชาติและมีอายุการเก็บเกี่ยวที่ยาวนานกว่าจะตัดดอกมาสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ได้ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือในอาหารเหลวจึงเป็นวิธีที่ช่วยลดระยะเวลาในการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้ (Tang and Zhong, 2002) สารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดหลินจือมีสรรพคุณช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยในการยับยั้งการเจริญและแพร่กระจายของเนื้องอก ป้องกันการเกิดมะเร็ง ป้องกันและควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Wasser, 2002) สารโพลิแซคคาไรด์โดยเฉพาะ ß-1,3-glucan จากเห็ดหลินจือจึงเป็นที่ต้องการของตลาดโลก ประกอบกับน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีส่วนประกอบของสารอาหารต่างๆและลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแหล่งอาหารตามธรรมชาติของเห็ดหลินจือ งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการเจริญเติบโต การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนของเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

นำน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในเขตอำเภอละงู จังหวัดสตูล ที่เก็บจากตอนกลางของระบบบำบัดน้ำทิ้งแบบ facultative pond (บ่อที่ 3) ใช้การเก็บแบบจ้วง (grab sampling) น้ำทิ้งที่เก็บได้ใส่ในภาชนะพลาสติกแล้วปิดฝาให้สนิท หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดเศษใบไม้และกิ่งไม้ออก หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ pH, Chemical Oxygen Demand (COD), Total Dissolved Solid (TDS), Total Suspended Solid (TSS), Carbohydrate, Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Total Phosphorus (TP), Total Potassium (TK) และ Iron (Fe) ตามวิธีของ APHA, AWWA, WEF (2005)

การทดสอบวิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่ได้จากแหล่งธรรมชาติในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เชื้อเริ่มต้น 2 วิธี คือ วิธี disk inoculum และ seed inoculum ดังนี้

- วิธี Disk inoculum ใช้เชื้อเริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองบนอาหารแข็งพีดีเอเป็นเวลา 7 วัน แล้วตัดเส้นใยเห็ดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้นนำไป

เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจำนวน 1 ลิตร ซึ่งบรรจุในโหลแก้วขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 5 นิ้ว x 15 นิ้ว x 5 นิ้ว เลี้ยงในสภาวะนิ่ง (static condition) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน แล้วจึงเก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดด้วยการกรองและล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำเส้นใยที่ได้ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (lyophilization) เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้งต่อไป

- วิธี Seed inoculum ใช้เชื้อเริ่มต้นจากการนำเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งพีดีเอ ซึ่งตัดด้วยคอร์กบอเรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบี (Sweet Potato Dextrose Broth: SPDB) ที่ประกอบด้วย มันเทศ 250 กรัม น้ำตาลเด็กโตรส 20 กรัม เปปโตน 1 กรัม วิตามินบีหก 0.5 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร (สุวิทย์ และ ไชนะ, 2555) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยก seed และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แล้วนำ seed ที่ได้ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเช่นเดียวกับวิธี Disk inoculum

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มต้นในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ใช้ Seed inoculum ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบีเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน อัตราร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 9 วัน กรองและล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไปได้ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้งที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป (น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น = น้ำหนักสุดท้าย - น้ำหนักเริ่มต้น)

การศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลือง

ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มให้เท่ากับ 4, 5, 6 และ 7 เพื่อทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองเทียบกับ control ที่มีพีเอช 7.93 โดยใช้ Seed inoculum ที่เหมาะสมจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 16 วัน หลังจากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้ง ปริมาณโพลิแซคคาไรด์ และเบต้ากลูแคน ต่อไป

การสกัดและวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคน

1. การสกัดสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคน

ทำการสกัดเส้นใยแห้งของเห็ดหลินจือขอบเหลืองตามวิธีของ Suwanno *et al*. (2005) โดยนำเส้นใยเห็ดที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้ว 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 120 นาที แล้วนำไปเติม silicon dioxide 2 กรัม บดด้วยโกร่งจนละเอียด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายใสส่วนที่ 1 ส่วนของตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ได้สารละลายใสส่วนที่ 2 ส่วนของตะกอนที่เหลือนำไปเติมโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 20 นาที ได้สารละลายใสส่วนที่ 3 ส่วนของตะกอนนำมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ได้สารละลายใสส่วนที่ 4 นำสารละลายใสทั้ง 4 ส่วนที่ได้มารวมกัน

2. การวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคน

2.1 วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric Colorimetric โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dubios *et al*. (1956) ซึ่งใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu รุ่น UV-1601)

2.2 วิเคราะห์ปริมาณ ß -glucan ด้วยวิธี Aniline blue (Suwanno *et al*., 2005) โดยใช้ ß -1,3-D-glucan (Fluka) เป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง fluorescence spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation 393 นาโนเมตร และ emission 479 นาโนเมตร (fluorescence intensity = total fluorescence – auto fluorescence)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองที่วางไว้ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มจากระบบบำบัดแบบ facultative บ่อที่ 3 พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 7.93 ค่าซีโอดีเท่ากับ 7,286.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าของแข็งละลายน้ำได้ทั้งหมดและของแข็งแขวนลอยทั้งหมดอยู่ที่ 11,720 และ 1,900 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณธาตุอาหารอื่นๆ ในน้ำทิ้ง ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และเหล็ก อยู่ที่ 4.30, 436.66, 14.96, 280.10, 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่พบว่ามีค่าต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างน้ำทิ้งที่ใช้นำมาจากระบบบำบัดน้ำเสียตอนกลาง ซึ่งมีการบำบัดและย่อยสลายสารอินทรีย์ไปบ้างบางส่วนแล้ว ทำให้สารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทิ้งมีปริมาณความเข้มข้นลดลง แต่ยังคงเหลือปริมาณสารอาหารที่เป็นประโยชน์ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไนโตรเจน และธาตุอาหารที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดทดแทนแหล่งอาหารตามธรรมชาติได้

ผลการทดสอบวิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

จากการศึกษาพบว่า วิธี Disk inoculum เชื้อเห็ดไม่สามารถเจริญได้เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม (Figure 1a) ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเชื้อจะอยู่ในระยะ lag phase เป็นระยะเวลานานเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยวิธีนี้จะทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ต่ำเนื่องจากมีสภาวะกดดันสูงจากสภาพแวดล้อมของอาหารที่เปลี่ยนจากของแข็งเป็นของเหลว ส่วนวิธี Seed inoculum เส้นใยเห็ดจะเกิดการเจริญเติบโตลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ลักษณะของเส้นใยมีสีขาว จับตัวกันเป็นแผ่นบางๆ

(Figure 1b) ให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 0.6 กรัมต่อลิตร หลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 16 วัน ซึ่งวิธี Seed inoculums นี้เส้นใยของเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีดีบีก่อนแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มสามารถปรับตัวได้มากกว่า เนื่องจากสภาวะกดดันจากสภาพแวดล้อมของอาหารน้อยกว่าทำให้เส้นใยของเห็ดเจริญเติบโตได้สูง โดยทั่วไปมักใช้วิธี Pre-culture เพื่อให้เชื้อได้ปรับสภาพและทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายที่ดีกว่า (Wagner *et al*., 2003)

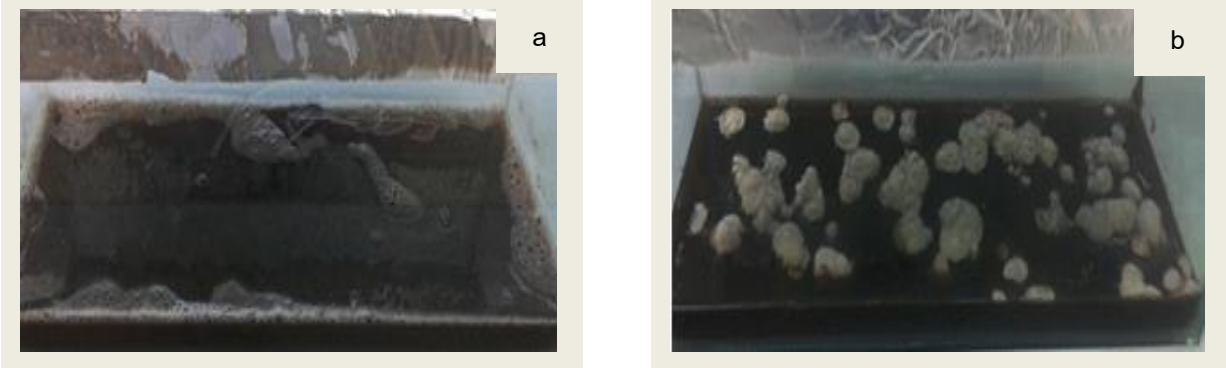


Figure 1 Characteristic of *Ganoderma calidophilum* mycelial growth in palm oil mill effluent at room temperature for 16 days: a. Disk inoculum and b. Seed inoculum.

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มต้นในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

พบว่าการเตรียม Seed inoculum ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเอสพีดีบีเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเป็นระยะเวลา 9 วัน เชื้อเห็ดสามารถให้ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 1.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ Seed inoculum ที่ใช้เวลาเตรียม 3 และ 5 วัน (Figure 2) ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียม seed inoculum มีผลต่อขนาดของ pellet โดยที่ระยะเวลา 7 วัน seed inoculum จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ pellet 0.99 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าที่ระยะเวลา 5 วัน และ 3 วัน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.66 เซนติเมตร และ 0.36 เซนติเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของ pellet ที่ใหญ่กว่าจะส่งผลให้ seed inoculum สามารถปรับตัวและทนต่อสภาพแวดล้อมของอาหารที่เปลี่ยนไปได้ดีกว่า จึงทำให้เส้นใย *Ganoderma calidophilum* สามารถเจริญเติบโตและสร้างน้ำหนักเส้นใยแห้งมากขึ้นเช่นกัน จากงานวิจัยของ Ding *et al*., 2012 ที่เตรียม seed inoculum จากเชื้อ *Ganoderma lucidum* ในอาหาร seed medium (กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.5 กรัมต่อลิตร และ แมกนีเซียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร) พบว่า ขนาดของ pellet สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก (S) จะพบในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ขนาดกลาง (M) จะเกิดในระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 2-6 วัน และ ขนาดใหญ่ (L) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 7-9 วัน ซึ่งจากผลการทดลองขนาดของ pellet ที่ระยะเวลา 7 วัน มีขนาดใหญ่กว่า pellet ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 5 และ 3 วัน เช่นกัน

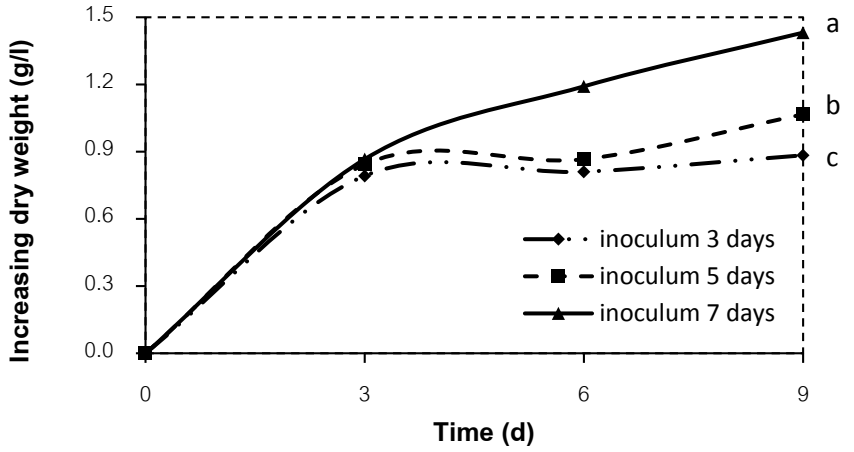


Figure 2 Effect of seed inoculum preparation on mycelial dry weight of *Ganoderma calidophilum* cultivated with palm oil mill effluent on a rotary shaker (120 rpm) at room temperature for 9 days.

ผลการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มต่อการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลือง

จากการศึกษาพบว่า ที่ระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 เชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองให้ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด 1.2 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 16 วัน ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับค่าพีเอชเริ่มต้นอื่นๆ โดยที่ระดับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5 ,7 และ 7.93 เชื้อเห็ดให้ค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งเท่ากับ 0.752, 0.986, 0.875 และ 0.609 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลาเพาะเลี้ยง 16 วัน (Figure 3)

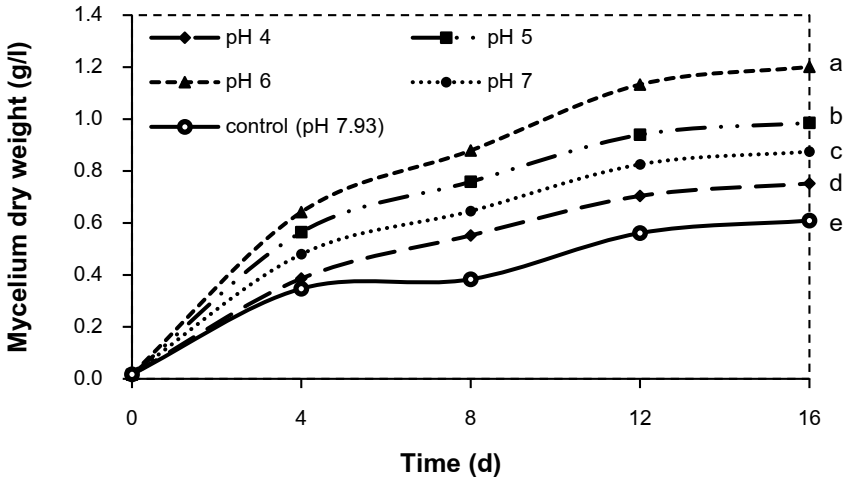


Figure 3 Effect of different initial pH of palm oil mill effluent on mycelial dry weight of *Ganoderma calidophilum*, cultivated at static condition and room temperature.

ผลการวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคน

พบว่าเชื้อเห็ดหลินจือขอบเหลืองที่เพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 สามารถผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และสารเบต้ากลูแคนได้สูงสุดเท่ากับ 330.00 และ 148.12 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์

แห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในระดับอื่นๆ (Figure 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al*. (1999) ที่เพิ่มระดับพีเอชเริ่มต้นของสารอาหารวายเอฟเอ็มในการเพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* จากพีเอช 3 เป็นพีเอช 6 โดยการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อสามารถผลผลิตสารเอกโซโพลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจาก 4.1 กรัมต่อลิตร เป็น 20.1 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fang and Zhong (2002) เพาะเลี้ยง *Ganoderma lucidum* ในอาหารวายเอฟเอ็มที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่าเชื้อให้ผลผลิตของชีวมวลสูงสุดที่ 17.3 กรัมต่อลิตรโดยน้ำหนักแห้ง ส่วน Endo-polysaccharide จะให้ผลผลิตสูงสุดในช่วงของค่าพีเอช 5.5-7.0 ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารจะมีผลต่อการละลายของเกลือในอาหาร รูปร่างและขนาดของเซลล์ การทำงานของผนังเซลล์ การลำเลียงสารอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้การสร้างผลผลิตของเซลล์เพิ่มขึ้น (Vladimir, 2012)

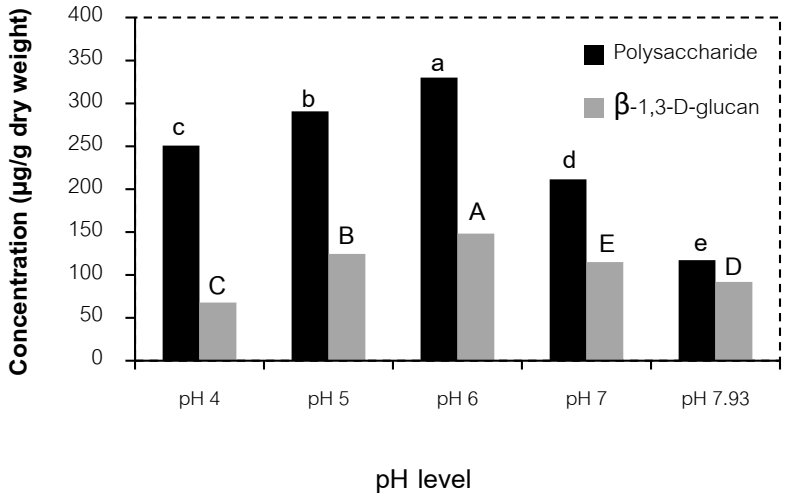


Figure 4 Effect of different initial pH of palm oil mill effluent on polysaccharide and ß-1,3-D-glucan contents of *Ganoderma calidophilum* cultivated at static condition and room temperature.

สรุป

การใช้เชื้อเริ่มต้นแบบ Seed inoculum เส้นใยของเห็ดหลินจือขอบเหลืองสามารถเจริญเติบโตในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ดีกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นแบบ Disk inoculum การเตรียม Seed inoculum ที่เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือขอบเหลืองในอาหารเหลวเอสพีดีบีเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร เพื่อเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 พบว่าเชื้อเห็ดให้น้ำหนักเส้นใยแห้ง 1.2 กรัม ให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนเท่ากับ 330 และ 148.12 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเส้นใยแห้ง ตามลำดับ ซึ่งเทคนิคการเตรียม Seed inoculum และค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ในเชิงพาณิชย์ และเป็นวิธีการหนึ่งของการลดปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่จะปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากทุนบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2554 และทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2555 - 2556

เอกสารอ้างอิง

สุวิทย์ สุวรรณโถ และ ไชนะ มูเล็ง. 2555. การส่งเสริมการผลิตเส้นใยและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) โดยสภาวะของสารอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม** 31(4): 335-342.

Ahmad, A. L., S. Ismail, and S. Bhatia. 2003. Water recycling from palm oil mill effluent (POME) using membrane technology. **Desalination** 157: 87-95.

APHA, AWWA and WEF. 2005. **"Standard Methods for Examination of Water and Wastewater"**. American Public Heaith Association, American Water Work Association and Water Environment Federation (21thed.). Washington DC., USA.

Ding, Z. Y., Q. Wang, L. Peng, L. Zhang, Z. G. Gu, G. Y. Shi and K. C. Zhang. 2012. Relationship between mycelium morphology and extracellular polysaccharide production of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* in submerged culture. **Journal of Medicinal Plants Research.** 6(14): 2868-2874.

Dubios, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colometric method for determination of sugar and related substance. **Analytical Biochemistry** 28:350-356.

Fang, Q. H., and J. J. Zhong. 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology Progress** 18(1): 51-54.

Ho, C. C., Y. K. Tan and C. W. Wang. 1984. The distribution of chemical constituents between the soluble and the particulate fraction of palm oil mill effluent and its significance on its utilization/treatment. **Journal of Agricultural Wastes** 11: 61-71.

Lee, K. M., S. Y. Lee, and H. Y. Lee. 1999. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 88: 646–50.

Suwanno, S., K. Nakamura, Y. Aman, M. Shida and I. Horiuchi. 2005. Development of the method for efficient disruption and rapid extraction on the ß -1,3-glucan determination from the mycelia of Ganoderma lucidum. **Japanese Society of Mushroom Science and Biotechology** 13: 83-93.

Tang, Y. J. and J. J. Zhong. 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 20-28.

Vladimir, E. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushroom: bioprocesses and products (review). **International Journal of Medicinal Mushroom** 14(3): 211-239.

Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sasaki, M. A. L. A. Amazonas and M. Berovic. 2003. Current techniques for the cultivation of Ganoderma lucidum for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. **Food Technology and Biotechnology** 41: 371-382.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomudulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60: 258-274.

Wu, T. Y., A. W. Mohammad, J. Md. Jahim and N. Anuar. 2007. Palm oil mill effluent (POME) treatment and bioresources recovery using ultrafiltration membrane: Effect of pressure on membrane fouling. **Biochemical Engineering Journal** 35: 309-317.