รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) บนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

(Biomass and polysaccharide production from *Schizophyllum commune* on solid substrate of Empty Fruit Bunches and Oil Palm Frond)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ

คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

คำนำ

รายงานผลการวิจัย เรื่องการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) บนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ซึ่งได้ทำวิจัยโดยคณาจารย์ และนักศึกษาปริญญาโท ที่สังกัดหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการศึกษานี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยสำนักงานวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2552 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) สำรวจ เก็บรวบรวมสายพันธ์เห็ดแครงในพื้นที่ภาคใต้โดยเน้นที่จังหวัด พัทลุงสงขลา และยะลา 2) วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Shizophillan จากตัวอย่างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของเห็ดพื้นเมืองภาคใต้ต่อปริมาณสารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา เพื่อเพิ่มระดับการผลิตสาร Shizophillan จากเห็ดแครงในระดับอุตสาหกรรม 3) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากสายพันธุ์เห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะลิกโนเซลลูโลส โดยเน้นที่วัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน 4) ศึกษาสภาวะที่เหมาะในการการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จาก ชีวมวลเห็ดแครงที่ผลิตได้ โดยเน้นวิธีที่มีประสิทธิภาพและประหยัดพลังงาน

คณะผู้วิจัยโครงการใคร่ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยและพัฒนา ที่สนับสุนเงินทุนในการวิจัย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ และนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อมทุกคน ที่ร่วมกันทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าส่วนที่เป็นประโยชน์และมีคุณค่าของงานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจ ของชุมชนในพื้นที่ภาคใต้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2555

คำนำ

รายงานผลการวิจัย เรื่องการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) บนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ซึ่งได้ทำวิจัยโดยคณาจารย์ และนักศึกษาปริญญาโท ที่สังกัดหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โครงการศึกษานี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยสำนักงานวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2552 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) สำรวจ เก็บรวบรวมสายพันธ์เห็ดแครงในพื้นที่ภาคใต้โดยเน้นที่จังหวัด พัทลุงสงขลา และยะลา 2) วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Shizophillan จากตัวอย่างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของเห็ดพื้นเมืองภาคใต้ต่อปริมาณสารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา เพื่อเพิ่มระดับการผลิตสาร Shizophillan จากเห็ดแครงในระดับอุตสาหกรรม 3) ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากสายพันธุ์เห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะลิกโนเซลลูโลส โดยเน้นที่วัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน 4) ศึกษาสภาวะที่เหมาะในการการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จาก ชีวมวลเห็ดแครงที่ผลิตได้ โดยเน้นวิธีที่มีประสิทธิภาพและประหยัดพลังงาน

คณะผู้วิจัยโครงการใคร่ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยและพัฒนา ที่สนับสุนเงินทุนในการวิจัย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ และนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อมทุกคน ที่ร่วมกันทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าส่วนที่เป็นประโยชน์และมีคุณค่าของงานวิจัยชิ้นนี้ จะเป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจ ของชุมชนในพื้นที่ภาคใต้ต่อไป

คณะผู้วิจัย
ธันวาคม 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงการนำวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันกลับมาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง เพื่อผลิตชีวมวลและสาร Schizophyllan จากผลการทดสอบการเจริญเติบโต วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan ของเชื้อเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่แยกได้จากตัวอย่างเห็ดแครงจากแหล่งธรรมชาติใน 3 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพัทลุง สงขลา และยะลา พบว่าเห็ดแครง S2 มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 9.0 เซนติเมตร มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 6.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และสาร Schizophyllan เท่ากับ 1.98 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Anilin blue เท่ากับ 4.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จากผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครง 3 ไอโซเลต (S1, S2, Y3) บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วน 100:0, 90:10, 80:20,70:30 และ60:40 ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะร้อยละ 80 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 พบว่าเชื้อเห็ดแครงทั้ง 3 ไอโซเลต มีการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วน (70:30) มีการเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ) โดยที่เชื้อเห็ดแครง S2 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเท่ากับ 1.44 กรัมต่อน้ำหนักวัสดุเพาะ 100 กรัมวัสดุเพาะ หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เท่ากับ 19 ด้วยรำข้าว และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในภาชนะบรรจุกล่อง PVC (Polyvinyl chloride) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง พบว่าเชื้อเห็ดแครง S2 ให้ค่า BE (biological efficiency : BE) เท่ากับร้อยละ 46.14 ดอกเห็ดสดเฉลี่ยเท่ากับ 12.86 กรัม ดอกเห็ดมีสีขาวนวล ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 25 วัน และจากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ของดอกเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงในภาชนะบรรจุกล่อง PVC พบว่าสารโพลิแซคคาไรด์มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 12.73 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 60 และสาร Schizophyllan มีปริมาณสูงสุดเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 120 นาที เท่ากับ 4.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue และเท่ากับ 9.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

ABSTRACT

This research focuses on the study of empty fruit bunches and oil palm to be used as substrate for *Schizophylum commune* cultivation for the production of biomass and Schizophyllan. The result showed that mycelium growth polysaccharide and Schizophyllan analysis of *Schizophylum commune* 9 isolates from natural sources in the 3 southern provinces of Phatthalung, Songkhla and Yala in Thailand. *Schizophylum commune* S2 has the highest growth rate with a colony diameter of 9.0 cm the maximum polysaccharide content in rang 6.04 mg/dry cell and Schizophyllan content 1.98 mg/dry cell by aniline blue assay 4.19 mg/dry cell by HPLC. The 3 isolates (S1, S2, Y3) of *Schizophyllum commune* mycelium were cultivated on mixed substrate of empty fruit bunches and oil palm at the ratio of 100:0, 90:10, 80:20, 70:30 and 60:40. The initial moisture content was adjusted to 80 percent and initial spawn was adjusted to 5 percent. The result showed that 3 isolates of *Schizophyllum commune* had maximum growth when cultivated on mixed substrate of empty fruit bunches and oil palm (70:30). S2 had the maximum growth (weight dry loss substrate) 1.44 g/100 g substrate. After the *Schizophyllum commune* S2 were cultivated on mixed substrate of empty fruit bunches and oil palm (70:30), the initial moisture content was adjusted to 60 percentages the carbon and nitrogen ratio (C/N) was adjusted to 19 by adding rice bran and initial Spawn was adjusted to 5 percentages on Polyvinyl chloride (PVC) container box had the optimum condition on the biomass *Schizophyllum commune* production. The result showed that the S2 gave maximum Biological (BE) at 46.14 percentages and had average fresh wight of fruit body at 12.86 g. The fruit body obtained from cultivation was white the 25^{th} of cultivation time. The result from the studies of optimum conditions for polysaccharide extraction from *Schizophyllum commune* S2 cultivated in PVC container box found maximum polysaccharide was obtained 12.73 mg/dry cell when extract at 110 °C with 60 minutes. And the maximum of *Schizophyllum commune* when extracted at 110 °C with 120 minutes was obtained 4.19 by aniline blue assay and 9.32 by HPLC assay.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยโครงการใคร่ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยและพัฒนา ที่สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ในการทำวิจัย รวมทั้งคณาจารย์ และนักศึกษาในหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อมทุกคน ที่ร่วมกันทำงานวิจัยนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าส่วนที่เป็นและมีคุณค่าชิ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจของชุมชนในพื้นที่ภาคใต้ต่อไป

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	(2)
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(13)
บทที่ 1 บทนา	1
1.1 บทนำต้นเรื่อง	1
1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.2.1 สถานการณ์ทั่วไปเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน	3
1.2.2 วัสดุเหลือทิ้งปาล์มน้ำมัน	4
1.2.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน	7
1.2.4 วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส	12
1.2.5 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส	12
1.2.6 การย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยเชื้อรา	15
1.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลเห็ดและการผลิตโพลิแซคคาไรด์	17
1.2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ด	23
1.2.9 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดแครง	25
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	29
1.4 ขอบเขตการวิจัย	29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการ 30

2.1 วัสดุ อุปกรณ์ 30

2.2 วิธีวิจัย 31

2.2.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด 32

2.2.2 การแยกเชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์ 32

2.2.3 การทดสอบอัตราการเจริญเติบโต 32

2.2.4 การวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์ 33

2. 2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง และสารโพลิแซคคาไรด์ 34

2.2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดแครง 39

2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเห็ดแครง 39

2.2.8 การวางแผนการทดลอง 39

บทที่ 3 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง 40

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแครงในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย 40

3.2 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดแครงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ 42

3.3 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี 45

3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan 48

3.4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ 48

3.5 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง และการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ 50

3.5.1 ผลของอัตราส่วนวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน) 52

3.5.2 ผลของความชื้นในวัสดุเพาะเริ่มต้นต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง 57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง	59
3.5.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง	68
3.5.5 ผลของภาชนะบรรจุต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง	70
3.6ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan	73
3.6.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์	74
3.6.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร Schizophyllan	75
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	76
4.1 สรุปผลการทดลอง	77
4.2 ข้อเสนอแนะ	77
เอกสารอ้างอิง	78
ภาคผนวก	87
งานวิจัยที่ตีพิมพ์	

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดปาล์มน้ำมัน	5
1.2	ปริมาณธาตุอาหารในเถ้าทะลายปาล์มเปล่า	9
1.3	แสดงอุณหภูมิและแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและการออกดอกขอเห็ด แต่ละชนิด	20
2.1	อัตราส่วนของวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง	34
3.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแครงในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง	40
3.2	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครงสายพันธุ์ภาคใต้ 9 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ภายใต้สภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน	42
3.3	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเอสพีบีดี ภายใต้สภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน	45
3.4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์	48
3.5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Schizophyllan (β-glucan)	50
3.6	ระยะเวลาการเจริญและผลผลิตเห็ด ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย	63
3.7	ระยะเวลาการเจริญและผลผลิตเห็ด ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วย NH_4Cl	63
3.8	ระยะเวลาการเจริญและผลผลิตเห็ด ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว	64
3.9	ตารางเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญและผลผลิตเห็ด ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วย ยูเรีย รำข้าว และ NH_4Cl	64

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3.10	ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ	69
3.11	ระยะเวลาการเจริญและผลผลิตเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในภาชนะบรรจุกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)	72
3.12	ปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในวัสดุเพาะเห็ดทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันก่อนเพาะ และหลังเพาะเห็ดแครง	74
ก.1	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Glucose ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	88
ก.2	อัตราส่วนการผสมของสาร Total Fluorescence	90
ก.3	อัตราส่วนการผสมของสาร Auto Fluorescence	90
ก.4	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน β-1,3-D-glucan ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	90
ข.1	องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด	93
ค.1	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดแครง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 20 วัน	94
ค.2	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง12 วัน	95
ง.1	การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครง S1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะ ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก	96
ง.2	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก	97

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.3	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง Y3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก	98
ง.4	ความยาวของเส้นใยเห็ด S1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง	98
ง.5	ความยาวของเส้นใยเห็ด S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง	99
ง.6	ความยาวของเส้นใยเห็ด Y3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันในหลอดทดลอง	99
ง.7	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ที่ระดับความชื้นต่างๆ	100
ง.8	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะ ทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย	101
ง.9	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl	101
ง.10	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว	102
ง.11	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเริ่มต้นระดับต่างๆ	102
ง.12	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PVC)	102

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.11	น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเริ่มต้นระดับต่างๆ	103
ง.12	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PVC)	103
ง.13	ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง12 วัน ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric	103
ง.14	ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะ ในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric	104
ง.15	ปริมาณสาร Schizophyllan ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ทีเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน ด้วยวิธี Aniline blue	104
ง.16	ปริมาณสาร Schizophyllan ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน ด้วยวิธี Aniline blue	105
ง.17	ปริมาณสาร Schizophyllan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue	105
ง.18	ปริมาณสาร Schizophyllan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	106

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ประเทศส่งออกน้ำมันปาล์มในปี 2005	4
1.2	กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม	6
1.3	ขั้นตอนการผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่า	8
1.4	ขั้นตอนการเพาะเห็ดฟาง	10
1.5	องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส	13
1.6	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	13
1.7	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูไบโอส	14
1.8	แสดงโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	15
1.9	แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของลิกนิน	15
1.10	ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุเพาะวัสดุเพาะฟางข้าวโอ๊กรำข้าวโอ๊ก และกากเนื้อมะพร้าวต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม	22
1.11	ลักษณะทั่วไปของเห็ดแครง	25
1.12	โครงสร้างทางเคมีของเบต้ากลูแคน (Schizophyllan)	27
2.1	ขั้นตอนการเตรียมวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า	35
2.2	ขั้นตอนการเตรียมวัสดุเพาะทางใบปาล์มน้ำมัน	36
2.3	การเตรียมภาชนะบรรจุในการหมัก	39
3.1	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครงสายพันธุ์ภาคใต้ 9 ไอโซเลตเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอภายใต้สภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน	43
3.2	ลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีเห็ดแครงสายพันธุ์ภาคใต้ 9 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอภายใต้สภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน	44
3.3	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี ภายใต้สภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	46

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.4	ลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี ภายใต้สภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน	47
3.5	เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอและเอสพีบีดี ภายใตสภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน	48
3.6	น้ำหนักแห้งที่หายไป ของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S1 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80ในถุงพลาสติก	54
3.7	น้ำหนักแห้งที่หายไป ของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก	54
3.8	น้ำหนักแห้งที่หายไป ของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง Y3 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก	55
3.9	ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง S1 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์ม อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80ในหลอดทดลอง	55
3.10	ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์ม อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80ในหลอดทดลอง	56
3.11	ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง Y3 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์ม อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80ในหลอดทดลอง	56
3.12	ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มอัตราส่วน 70:30 ความชื้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก (ก) และหลอดทดลอง(ข)	57
3.13	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์ม (70:30) ปรับความชื้นระดับต่างๆ	58

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.14	ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับความชื้นเริ่มต้นระดับต่างๆ	59
3.15	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มน้ำมัน และทางใบปาล์ม (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย	61
3.16	น้ำหนักแห้งของที่หายไปวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว	62
3.17	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วนอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl	62
3.18	ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย	65
3.19	ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl	66
3.20	ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว	67
3.21	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม เปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ	69

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.22	ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว	69
3.23	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม เปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ	70
3.24	ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ	71
3.25	น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)	72
3.26	ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)	72
ก.1	กราฟมาตรฐาน Glucose วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol Sulfuric colorimetric	89
ก.2	ลักษณะกราฟมาตรฐานของสาร β-glucan	91
จ.1	ลักษณะโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน β-glucan	107
จ.2	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง P1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	107
จ.3	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง P2 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	107

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
จ.4	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง P3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	108
จ.5	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง S1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	108
จ.6	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	108
จ.7	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง S3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	109
จ.8	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง Y1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	109
จ.9	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง Y2 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	109
จ.10	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของตัวอย่างเห็ดแครง Y3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน	110
จ.11	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 60 นาที	110
จ.12	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 นาที	110

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
จ.13	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 120 นาที	111
จ.14	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 60 นาที	111
จ.15	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 60 นาที	111
จ.16	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 90 นาที	112
จ.17	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 120 นาที	112
จ.18	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที	112
จ.19	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 90 นาที	113
จ.20	ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 120 นาที	113

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

HPLC	=	High performance liquid chromatography
SPBD	=	Sweet Potato Peptone Vitamin B_6 $CaCl_2$ Dextrose
BE	=	Biological efficiency
C	=	Carbon
N	=	Nitrogen
P	=	Phosphorus
K	=	Potassium
Ca	=	Calcium
Mg	=	Magnesium
Mo	=	Molybdenum
B	=	Boron
Cu	=	Copper
Mn	=	Manganese
Zn	=	Zinc
Cl	=	Chloride
$NaCO_3$	=	Sodium carbonate
PVC	=	Polyvinyl chloride
PP	=	Polypropylene
CO_2	=	Carbon dioxide
CO	=	Carbon monoxide
SO_2	=	Sulfurdioxide
DO	=	Dissolved Oxygen
IPS	=	Inerpolysachar
EPS	=	Exopolysacharide
FMN	=	Flavin mono-nucleotide
FAD	=	Flavin adenine dinucleotide
CRD	=	Completely Randomized Design

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชชนิดเดียวที่ให้ผลผลิตน้ำมันต่อหน่วยพื้นที่มากกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ และสามารถปลูกได้เฉพาะในเขตร้อนชื้นเท่านั้น ประเทศที่เป็นผู้ผลิตน้ำมันปาล์มดิบมากที่สุดในของโลกปี 2555 คือ ประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย โคลัมเบีย และไนจีเรีย ตามลำดับ ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากในจังหวัดทางภาคใต้ และมีอัตราการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลผลิตน้ำมันปาล์มในประเทศไทยมากกว่าร้อยละ 80 ผลิตเพื่อตอบสนองความต้องการใช้ภายในประเทศ โดยสามารถแบ่งการใช้น้ำมันปาล์มออกเป็น 3 ส่วนหลักๆ คือ ใช้เพื่อการบริโภค (ร้อยละ 60)ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทน (ร้อยละ 28) และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่างๆ (ร้อยละ 13) ในกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มนอกจากได้วัตถุดิบที่เป็นน้ำมันปาล์มดิบแล้ว ยังมีวัสดุเหลือทิ้งเกิดขึ้น ซึ่งจะเกิดขึ้นตั้งแต่กระบวนการผลิตทางการเกษตร และจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบในโรงงานอุตสาหกรรม วัสดุเหลือทิ้งที่เกิดจากกระบวนการผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ทางใบปาล์มเกิดขึ้นจากขั้นตอนการตัดแต่งต้นปาล์ม และจากการเก็บเกี่ยวผลผลิต มีปริมาณสูงถึง 2,400,000 ตันต่อปี วัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวส่วนใหญ่ถูกนำกลับมาใช้เป็นวัสดุคลุมโคนต้นปาล์ม ใช้เป็นอาหารสัตว์ ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งจำนวนมากที่ถูกทิ้งไว้อย่างไร้ประโยชน์ และจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งได้แก่ เส้นใยปาล์ม กะลาปาล์ม เมล็ดในปาล์ม และทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งทะลายปาล์มเปล่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งอื่นๆที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสกัดโดยปริมาณสูงถึง 2,000,000 ตันต่อปี (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2555 ;สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) วัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าเหลือทิ้งที่กองทิ้งไว้จะมีน้ำมันหลงเหลืออยู่ เมื่อฝนตกน้ำมันจะถูกชะล้างออกมาปะปนกับน้ำฝนไหลลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำโดยจะกีดขวางการส่องผ่านของแสงแดดสู่แหล่งน้ำซึ่งจะส่งผลกระผลต่อการสังเคราะห์แสงของพืช ทำให้ออกซิเจนละลายน้ำ (DO)ในแหล่งน้ำลดลง และกีดขวางการหมุนเวียนอากาศในแหล่งน้ำ ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ทะลายปาล์มเปล่าที่กองทิ้งไว้เป็นจำนวนมากจะทำให้เกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็น และมีทัศนียภาพที่ไม่ดี ปัจจุบันมีการจัดการวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มและทาง

ใบปาล์มในรูปแบบต่างๆ เช่น ผลิตพลังงาน เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ และนำวัสดุดังกล่าวมาผ่านกระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยเชื้อราในการแปรสภาพและย่อยสลาย กลุ่มของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวได้ดี และรวดเร็ว คือ กลุ่มของเห็ด เช่น เห็ดฟาง เห็ดตระกูลนางรม เห็ดแครง เห็ดกระดุม ซึ่งเห็ดดังกล่าวจะเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต (กรมควบคุมมลพิษ, 2553; Sanchez, 2009)

กลูแคน (Glucan) คือ สารประกอบประเภทโพลิแซคคาไรด์ เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช รา และจุลินทรีย์บางชนิดในขณะที่เจริญเติบโต ซึ่ง Glucan ที่มีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ และถูกนำมาใช้ทางการแพทย์จะอยู่ในรูปของ β-1,3-Glucan และ β-1,6-Glucan แหล่งของ β-Glucan ที่สำคัญได้แก่ ยีสต์ มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 70 รองลงมาคือ เห็ดตระกูลหลินจือ มีปริมาณร้อยละ 50 และข้าวบาเลย์มีปริมาณร้อยละ 11 (Manz and Pizzoferrato, 2000; Demirbas, 2005) ซึ่ง β-Glucan ที่สกัดได้จากยีสต์ และเห็ดตระกูลนางรมมีราคาแพงจึงทำให้คนที่มีฐานะเท่านั้นที่สามารถบริโภคได้ ส่วนเห็ดแครงเป็นเห็ดที่พบได้โดยทั่วไปในท้องถิ่นมีคุณค่าทางอาหารสูงมีสาร β-Glucan ที่มีชื่อว่า Schizophyllan ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีคุณสมบัติในการรักษาโรคมะเร็งเมื่อใช้ร่วมกับยา (Chemotheraphy) และการฉายรังสี (Radiotheraphy) นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Aaejoye *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2008) ดังนั้นหากมีงานวิจัยที่สามารถสนับสนุนเกี่ยวกับเห็ดแครงถึงคุณสมบัติที่สำคัญทางเภสัชศาสตร์ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย และป้องกันการเกิดและรักษาโรคมะเร็งได้ น่าจะเป็นช่องทางหนึ่งที่จะส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคเห็ดแครงเพื่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น และยังสามารถเป็นแหล่งของ β-Glucan ที่มีราคาที่ถูกเมื่อเปรียบเทียบกับ β-Glucan จากเห็ดหลินจือ ซึ่งประชาชนทั่วไปยังสามารถซื้อเพื่อบริโภคได้ อีกทั้งเห็ดแครงในแหล่งธรรมชาติปัจจุบันมีน้อยลง ส่งผลให้เห็ดแครงเป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่มีการมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ประกอบกับการนำวัสดุเหลือทิ้งจากปาล์มน้ำมันและอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันมาใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงสามารถช่วยลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางใบปาล์มและทะลายปาล์มเปล่าที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากเห็ดแครงสามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวไปเป็นสารอาหารในการสร้างเซลล์ในกระบวนการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวใช้เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้ นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง และสามารถลดต้นทุนในการผลิตเห็ดเนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีราคาถูก ซึ่งปัจจุบัน

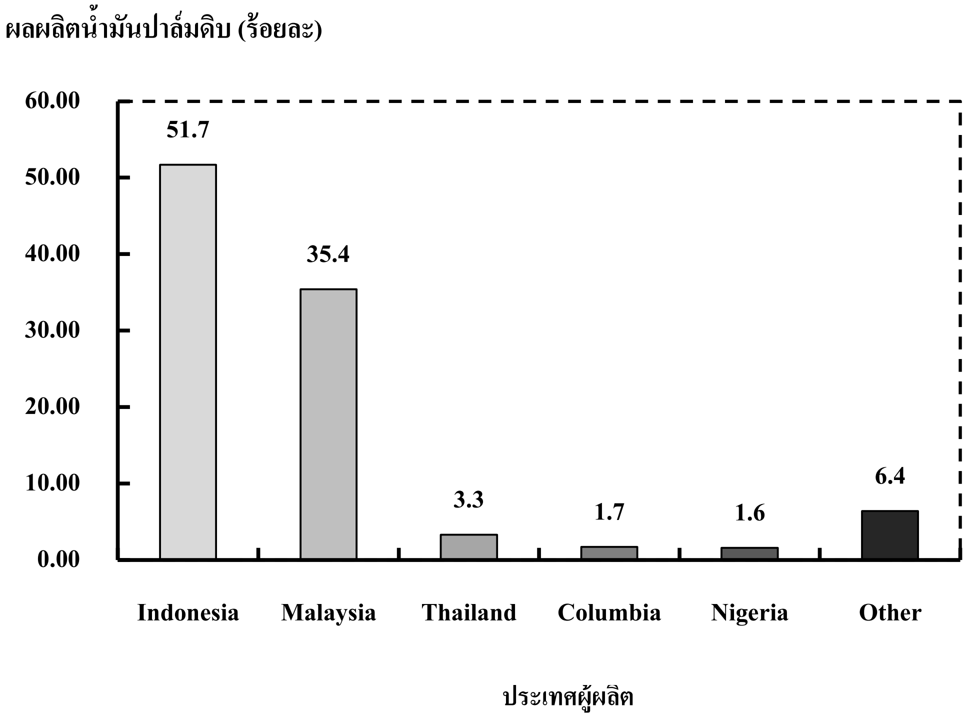
วัสดุเหลือทิ้งทางใบปาล์มน้ำมันมีจำนวนมากและมีการนำกลับมาใช้น้อย ประกอบกับขี้เลื่อยในปัจจุบันมีราคาแพงขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตปาล์มน้ำมันได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน กลับมาใช้ประโยชน์โดยนำมาใช้เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง เพื่อเป็นวัสดุทางเลือกใหม่ในการเพาะเห็ดเพื่อช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเห็ดเนื่องจากวัสดุดังเหลือทิ้งกล่าวมีราคาถูก โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวล และสารโพลิแซคคาไรด์ของเห็ดแครงสายพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพัทลุง สงขลา และยะลา ที่มีคุณสมบัติในทางเภสัชศาสตร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร Schizophyllan (β-1,3-Glucan) ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเศษเหลือทิ้งปาล์มน้ำมัน

1.2 การตรวจเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 สถานการณ์ทั่วไปเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน

อาเซียนเป็นแหล่งผลิตน้ำมันปาล์มหลักของโลก มีประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ โดยผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบที่ผลิตได้ในปี 2555 มีปริมาณประมาณ 27 ล้านตัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 51.7 และ 18 ล้านตัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 35.4 ปริมาณผลผลิตรวมกันมากกว่าร้อยละ 87 ของปริมาณผลผลิตน้ำมันปาล์มทั้งหมด ส่วนประเทศไทยเป็นผู้ผลิตที่สำคัญเป็นอันดับสามรองลงมาจากประเทศอินโดนีเซีย และมาเลเซีย โดยที่ประเทศไทยผลิตน้ำมันปาล์มดิบได้ประมาณ 1.9 ล้านตัน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 3.3 ของปริมาณผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบทั้งหมด (รูปที่ 1.1) ในประเทศไทยปาล์มน้ำมันนับว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ปัจจุบันจำนวนเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมันมีมากกว่า 1.28 แสนครัวเรือน มีพื้นที่เพาะปลูก และพื้นที่ให้ผลผลิตประมาณ 4.28 และ 3.98 ล้านไร่ ตามลำดับ การผลิตน้ำมันปาล์มดิบของไทยในปี 2555 มีแนวโน้มขยายตัวร้อยละ 5-7 จากปีก่อนหน้า ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากภาครัฐได้มีการดำเนินยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันในช่วงปี 2551-2555 เพื่อเร่งผลักดันให้เกษตรกรขยายพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบเพื่อรองรับกับยุทธศาสตร์พลังงานทดแทน และลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นต่อความมั่นคงทาง ด้านอาหารของประเทศประกอบกับราคาผลปาล์มดิบในช่วง 4 ปีที่ผ่านมาปรับตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากเดิมที่มีราคาเฉลี่ยกิโลกรัมละ 4 บาทในปี 2552 ปรับขึ้นเป็นกิโลกรัมละ 6 บาทในปี 2555 เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชน้ำมันที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ โดยมีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงถึงร้อยละ 58 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย รองลงมาคือถั่วเหลือง มีส่วนแบ่งทางการตลาดร้อยละ 21 ในประเทศไทยผลผลิตน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 80 ผลิตเพื่อตอบสนองความต้องการภายในประเทศ

โดยสามารถแบ่งการใช้น้ำมันปาล์มออกเป็น 3 ส่วน คือ ใช้เพื่อการบริโภค (ร้อยละ 60) ทั้งในรูปแบบของน้ำมันพืชที่ใช้ในการประกอบอาหาร และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทน (ร้อยละ 28) สามารถช่วยลดการใช้น้ำมันดีเซลในการเพิ่มความมั่นคงทางด้านพลังงานให้กับประเทศ อีกทั้งยังจะช่วยลดปัญหาผลกระทบทางด้านสิ่งแวดล้อมอีกด้วย และเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่างๆ (ร้อยละ 13) เช่น สบู่ ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เคมีภัณฑ์ต่างๆ และอาหารสัตว์(ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2555 ; กรมการค้าภายใน, 2555;สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2555)



รูปที่ 1.1 ประเทศผู้ผลิตน้ำมันปาล์มในปี2005
ที่มา: ศูนย์วิจัยกสิกรไทย (2555)

1.2.2 วัสดุเหลือทิ้งปาล์มน้ำมัน

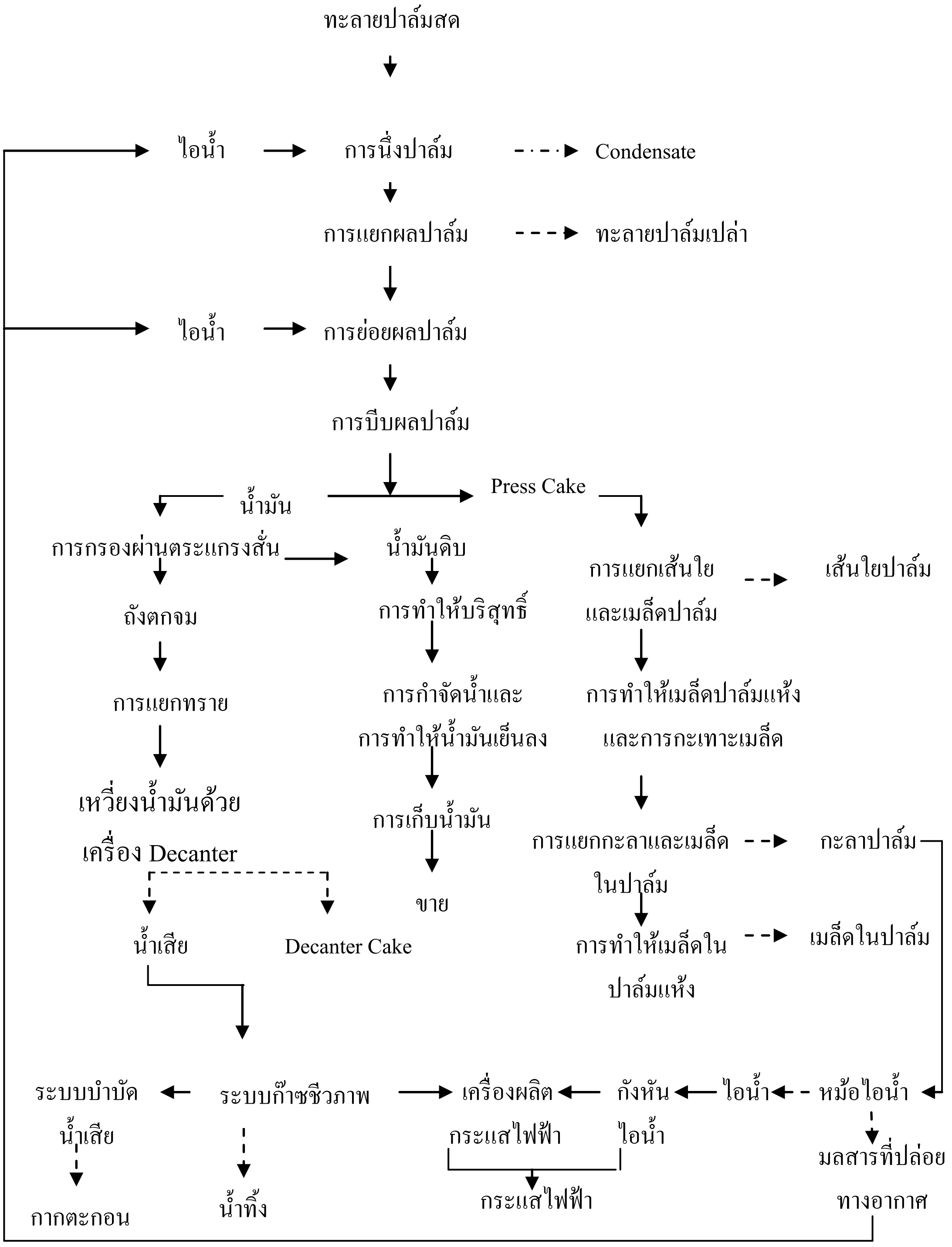
เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางและหลากหลายทั้งสินค้าบริโภคและอุปโภค ดังนั้นจึงมีการเพิ่มประสิทธิภาพและขยายพื้นที่ปลูกในพื้นที่นาร้าง ไร่ร้าง และพื้นที่เสื่อมโทรมจากการขยายพื้นที่เพาะปลูกทำให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นนอกจากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นยังก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ ทางใบปาล์มน้ำมันซึ่งจะ

เกิดขึ้นจากขั้นตอนการตัดแต่งต้นปาล์ม และขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยปกติเกษตรกรจะตัดทางใบปาล์มน้ำมันออกทุกๆ 15-20 วัน ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางใบปาล์มในปริมาณ 2,400,000 ตันต่อปี ซึ่งทางใบปาล์มเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีองค์ประกอบของโปรตีน เยื่อใย และไขมัน โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 5 เยื่อใยร้อยละ 38.5 ไขมันร้อยละ2.1 น้ำตาลร้อยละ 46.2 นอกจากนั้นกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งอาทิเช่น ทะลายปาล์มเปล่า เส้นใยปาล์ม กะลาปาล์ม ตะกอนดีแคนเตอร์ เป็นต้น (รูปที่ 1.2) วัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าที่เกิดจากกระบวนการแยกผลปาล์มมีปริมาณสูงถึง 2,000,000 ตันต่อปี จากผลปาล์มน้ำมันสดทั้งทะลายที่ป้อนเข้าสู่กระบวนการสกัดทั้งหมด 7,200,000 ตันต่อปี เส้นใยปาล์มที่เกิดจากการแยกเส้นใยมีปริมาณสูงถึง 800,000 ตันต่อปี กะลาปาล์มที่เกิดจากขั้นตอนการแยกเมล็ดในปาล์มน้ำมันมีปริมาณ 460,000 ตันต่อปี และกากตะกอนดีแคนเตอร์ที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนการเหวี่ยงน้ำมันด้วยดีแคนเตอร์มีปริมาณ 1,800,000 ตันต่อปี (ธีระ เอกสมทราเมษ และคณะ, 2551) โดยวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างๆดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดปาล์มน้ำมัน

วัสดุเหลือทิ้ง	N %	P %	Ca %	C %	Mg %	K %	B mg/kg	Zn mg/kg
ทะลายปาล์ม[1]	0.8	0.06	0.25-0.36	42	0.2	2.4	10-13	23
เส้นใยปาล์ม[2]	1.1	1.7-6.6	7	45.2	0.49	17-25	3.63	-
กะลาปาล์ม[2]	0.4	0.07	0.24	49.7	0.24	2.20	5.84	-
ตะกอนดีแคนเตอร์[3]	2.37	0.28	-	44.69	-	0.85	-	-

ที่มา : [1]กรมพัฒนาที่ดิน (2548); [2]Akpanabiatu และคณะ (2001); [1]Saletes และคณะ (2004); [3]วธิดา คะนะแนม (2552)



รูปที่ 1.2 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม ⟶ กระบวนการ - - ▸ วัสดุเหลือทิ้ง

ที่มา: ธีระ เอกสมทราเมษ และคณะ (2551)

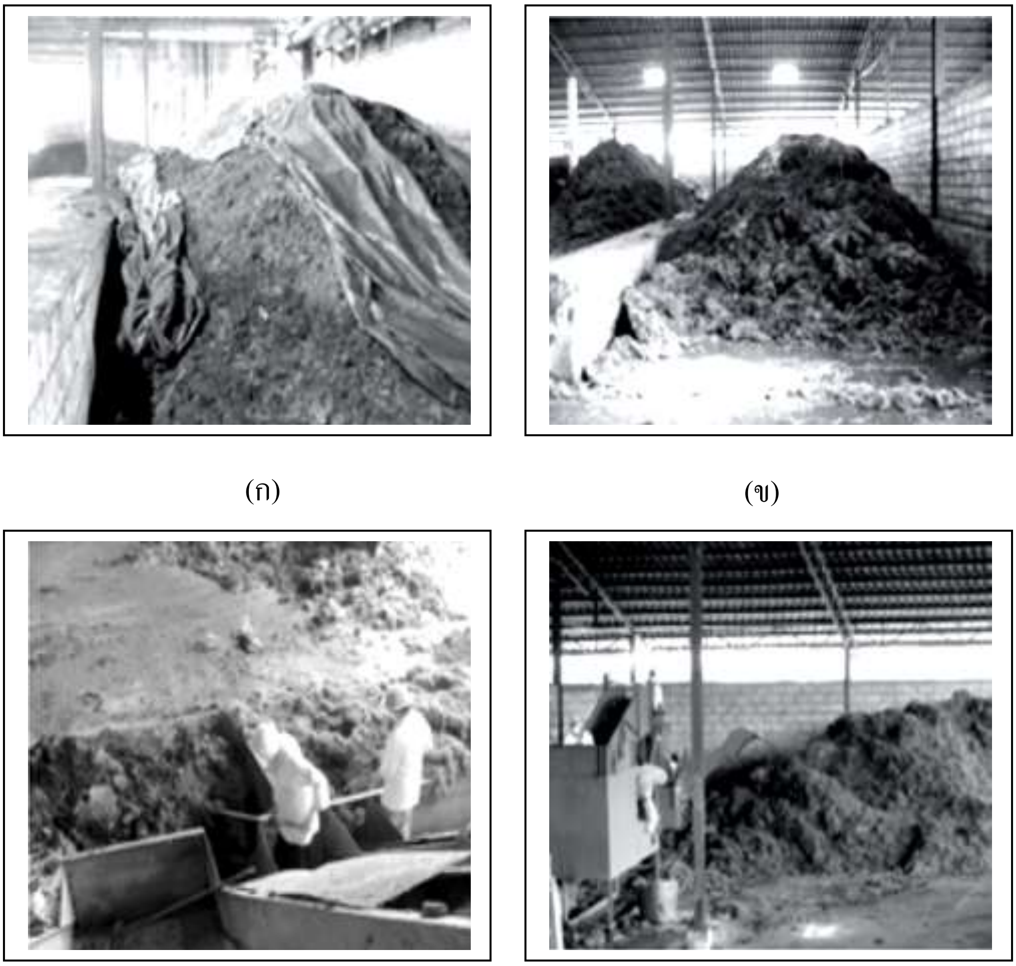
1.2.3 การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

ทะลายปาล์มเปล่า คือ และทางใบปาล์มน้ำมันเป็นวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสที่เกิดจากการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันและจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มที่มีปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเหลือทิ้งอื่นๆ เช่นต้นปาล์ม เส้นใยปาล์ม กะลาปาล์ม และเมล็ดในปาล์ม ปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าดังกล่าวถูกนำไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ เช่น อาหารสัตว์ ปุ๋ยหมัก วัสดุสำหรับเพาะเห็ด และผลิตพลังงาน ส่วนของทางใบปาล์มน้ำมันจะถูกนำกลับมาใช้ประโยชน์น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทะลายปาล์มเปล่า และวัสดุเหลือทิ้งอื่นๆที่เหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม โดยส่วนใหญ่จะใช้เป็นวัสดุคลุมดิน และใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ ซึ่งทางใบปาล์มน้ำมันที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตน้ำมันปาล์มในแต่ละปีที่มีปริมาณสูง ส่งผลทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันถูกกองทิ้งไว้โดยไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์อยู่อีกเป็นจำนวนมาก (ธีระ เอกสมทราเมษ และคณะ, 2551; วิโชติ จงรุ่งโรจน์, 2550; Luis, 2009)

1.2.3.1 ผลิตปุ๋ย

เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์ม มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) และธาตุอาหารอื่นๆ ดังนั้นทะลายปาล์มเปล่าจึงสามารถนำมาผลิตปุ๋ยอินทรีย์ โดยมีขั้นตอนในการผลิตเริ่มจากนำเศษทะลายปาล์มมาสับเป็นชิ้นให้ละเอียด จากนั้นนำไปคลุกเคล้าผสมกับตะกอนน้ำมันปาล์มก่อนที่จะฉีดเชื้อจุลินทรีย์ลงไป เพื่อเป็นตัวเร่งการย่อยสลายเศษทะลายปาล์มเปล่า บ่มในห้องบ่มทิ้งไว้ประมาณ 2 เดือน (รูปที่1.4 ก) กลับกองปุ๋ยทุกๆ 15 วัน เปิดกองปุ๋ยออก (รูปที่ 1.4ข) แล้วนำไปอบให้แห้ง นำปุ๋ยอินทรีย์ที่ผ่านการอบแห้งแล้วเข้าเครื่องร่อนคัดขนาดเพื่อให้ได้เนื้อปุ๋ยอินทรีย์ที่ละเอียดและขนาดเท่ากันก่อนนำมาเข้าเครื่องบรรจุกระสอบเพื่อจำหน่ายต่อไป (รูปที่ 1.3 ค) ส่วนกากที่เหลือนำกลับเข้าสู่ขั้นตอนการหมักด้วยจุลินทรีย์ใหม่ ซึ่งใช้ระยะเวลาดำเนินการประมาณ 2 เดือน (รูปที่ 1.4 ง) จากการทดลองพบว่าปุ๋ยอินทรีย์ที่ผลิตจากทะลายปาล์มเปล่าดังกล่าวเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับพืชเกษตรโดยเฉพาะปาล์มน้ำมัน ยางพารา และกาแฟ (ธีระพงศ์ จันทรนิยม, 2551; สุรัตน์ อัตตะ, 2553) ทะลายปาล์มเปล่าที่เหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันเมื่อนำไปเผาจะได้ขี้เถ้าเป็นจำนวนมาก ขี้เถ้าที่ได้จากการเผาสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ย เนื่องจากมีปริมาณธาตุอาหารโพแทสเซียมในปริมาณที่สูง (ตารางที่ 1.2) แต่ในกระบวนการเผาจะก่อให้เกิดฝุ่นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ที่เป็น

มลพิษทางอากาศเนื่องจากก๊าซเหล่านี้เป็นก๊าซเรือนกระจกที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโลกร้อน(Zen *et al.* , 2005)



(ก) (ข)

(ค) (ง)

รูปที่ 1.3 ขั้นตอนการผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่า

ที่มา: ธีระพงศ์ จันทรนิยม (2551)

นอกจากนั้นวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่ายังสามารถนำไปผลิตเป็นปุ๋ยหมัก ดังเช่นงานวิจัยต่อไปนี้ วธิดา คะนะแนม (2552) ศึกษาถึงผลของมูลไก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์ และดินแดง ในการผลิตปุ๋ยหมักจากทะลายปาล์มเปล่าโดยทำการศึกษาการหมักแบบกลับกองปุ๋ยและไม่กลับกองปุ๋ยหมัก จากการทดลองพบว่า การหมักแบบกลับกองปุ๋ยหมักเป็นวิธีการที่เหมาะสมกว่าการหมักแบบไม่กลับกองปุ๋ยหมัก โดยในการหมักแบบกลับกองปุ๋ยหมักจะต้องมีการเติมแหล่ง

ไนโตรเจนจากแหล่งต่างๆ เช่น มูลไก่ แต่ปัจจุบันมูลไก่มีราคาเพิ่มขึ้น ดังนั้นสามารถใช้กากตะกอนดีแคนเตอร์ เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนมูลไก่ได้ซึ่งอัตราส่วนในการหมัก คือ ทะลายปาล์มเปล่า 1.3 กิโลกรัมน้ำหนักเปียกต่อกากตะกอนดีแคนเตอร์ 2.3 กิโลกรัมน้ำหนักเปียก

ตารางที่ 1.2 ปริมาณธาตุอาหารในเถ้าทะลายปาล์มเปล่า

ธาตุอาหาร	ร้อยละ (น้ำหนักแห้ง)
โพแทสเซียม (K)	2.52
แคลเซียม (Ca)	0.38
โซเดียม (Na)	0.004
ซัลเฟอร์ (S)	0.036
ซิลิกอน (Si)	0.31
คลอไรด์ (Cl)	0.37

ที่มา: ฐานิตย์ เมธิยานนท์ และคณะ (2553)

1.2.3.2 วัสดุในการเพาะเห็ด

ทะลายปาล์มเปล่าที่เหลือทิ้งจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการเพาะเห็ดฟาง มีขั้นตอนในการเพาะ คือนำทะลายปาล์มเปล่าที่สกัดน้ำมันแล้ว เทลงในพื้นที่จะทำการเพาะเห็ด รดน้ำให้ทั่ว คลุมด้วยพลาสติกดำ 7 -10 วัน ในช่วง 7-10 วันนี้ให้รดน้ำ 2-3 ครั้ง จากนั้นให้นำทะลายปาล์มเปล่ามาจัดเป็นร่องยาวประมาณ 5-10 เมตร กว้าง 50 เซนติเมตร แล้วนำเชื้อเห็ดผสมอาหารเสริมมาหว่านบนร่องให้ทั่ว คลุมด้วยพลาสติกดำแล้วทิ้งไว้ 3 คืน นำไม้ไผ่ มาทำโครงแล้วคลุมด้วยพลาสติกดำทิ้งไว้ 7-10 วัน (รูปที่1.4 ก) ดอกเห็ดจะเริ่มออกดอกอย่างต่อเนื่อง 15-20 วัน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.5 ข (จิร์ ศรชัย, 2553)

(ก)

(ข)

รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการเพาะเห็ดฟาง

ที่มา: จีร์ ศรชัย (2553)

1.2.3.3 วัสดุคลุมดินในสวนปาล์มน้ำมัน

เนื่องจากทะลายปาล์มเปล่ามีองค์ประกอบของไนโตรเจน โพแทสเซียม แคลเซียม คาร์บอนไดออกไซด์ แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1.1 ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการเจริญเติบโตของต้นปาล์มน้ำมัน เมื่อนำทะลายปาล์มเปล่ามาใช้เป็นวัสดุคลุมดินในสวนปาล์มน้ำมัน จะเป็นการเติมธาตุอาหารให้กับต้นปาล์มน้ำมัน ช่วยเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุให้แก่ดิน และช่วยรักษาความชื้นให้แก่ดิน (Chiew, 2002) เช่นเดียวกันกับทางใบปาล์มน้ำมัน ซึ่งเกษตรกรมักจะใช้ทางใบปาล์มน้ำมันในการคลุมโคนต้นปาล์ม หรือกองไว้ระหว่างแถวของต้นปาล์ม เพื่อเก็บช่วยรักษาความชื้นในดิน ป้องกันการชะล้างพังทลายของหน้าดิน และเมื่อเกิดการย่อยสลายจะให้ธาตุอาหารที่ปาล์มน้ำมันสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยถึงการสกัดวิตามินอีจากทางใบปาล์มน้ำมัน พบว่าปาล์มน้ำมันยังเป็นแหล่งของวิตามินอีซึ่งมีปริมาณร้อยละ 0.49 ปริมาณของวิตตามินอีในทางใบปาล์มน้ำมันจะมีแนวโน้มปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อทางใบปาล์มมีอายุมากขึ้น (ธีระ เอกสมทราเมษ และคณะ, 2551)

1.2.3.4 ผลิตถ่านกัมมันต์

ก้านทะลายปาล์มเปล่าที่เหลือทิ้งจากระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มดิบ สามารถนำมาผลิตถ่านกัมมันต์ เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับก้านทะลายปาล์มเปล่า เนื่องจากถ่านกัมมันต์ มีความสามารถในการดูดซับสารเคมีจากก๊าซ และของเหลวในปริมาณที่สูง ซึ่งจากการทดลองพบว่า ถ่านกัมมันต์ที่ผลิตจากก้านทะลายปาล์มน้ำมัน มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับถ่านกัมมันต์

เกรดการค้าโดยมีความสามารถในการดูดซับไอโอดีนได้สูงถึง 1308 มิลลิกรัมต่อลิตร ดูดซับสารเมทิลีนบลูได้ 248 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นก้านทะลายปาล์มเปล่ามีคุณสมบัติที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตถ่านกัมมันต์ที่มีคุณภาพดีได้ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งอีกทางหนึ่งด้วย (สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และคณะ, 2548)

1.2.3.5 เชื้อเพลิงหุงต้ม

สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และธราพงษ์ วิทิตศานนท์ (2545) ได้ทำการศึกษาพัฒนาทะลายปาล์มเปล่าเป็นเชื้อเพลิงในการหุงต้ม โดยศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของการนำทะลายปาล์มเปล่ามาใช้เป็นเชื้อเพลิง และคุณสมบัติของเชื้อเพลิงที่ได้ โดยทำการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ค่าความร้อนของเชื้อเพลิงที่ได้จากทะลายปาล์มในลักษณะ 2 รูปแบบ คือ ฟืนทะลายปาล์มเปล่า และถ่านอัดแท่งที่ผ่านการคาร์บาไนซ์ จากการทดลองพบว่า สภาวะที่ดีที่สุดและประหยัดพลังงานที่สุดในการคาร์บาไนซ์ คือ ที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียสขึ้นไปเป็นเวลา 45 นาที โดยถ่านทะลายปาล์มที่ได้จากเครื่องอัดกำลังสูงจะมีค่าความร้อนสูงสุด คือ 4,387 แคลอรี่ต่อกรัม สำหรับการผลิตถ่านกะลาปาล์ม มีสภาวะที่ดีที่สุด คือการคาร์บาไนซ์ที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยให้ค่าความร้อนสูงสุดเท่ากับ 6,798 แคลอรี่ต่อกรัม

1.2.3.6 ผลิตเอมไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็นเอมไซม์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดที่เล็กลง สามารถละลายน้ำได้และซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เนื่องจากเซลลูเลสมีความสำคัญที่ช่วยในการย่อยสลายเซลลูโลส ดังนั้นจึงมีการศึกษาการผลิตเอมไซม์เซลลูเลสโดยใช้ทะลายปาล์มเป็นวัสดุตั้งต้นโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการสร้างเอมไซม์เซลลูเลส จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถผลิตเอมไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่สูงมีค่าเท่ากับ 0.0413 ยูนิต หลังจากที่ทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน (Alam, 2005)

1.2.3.7 อาหารสัตว์

ทางใบปาล์มที่เหลือจากการตัดแต่งต้นปาล์มและจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตเกษตรกรจะใช้เป็นอาหารสัตว์ทางใบปาล์มเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีองค์ประกอบของโปรตีน เยื่อใยและไขมัน โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 5 เยื่อใยร้อยละ 38.5 ไขมันร้อยละ2.1 น้ำตาลร้อยละ 46.2 แต่ทางใบปาล์มมีองค์ประกอบของโปรตีนค่อนข้างต่ำ ดังนั้นเมื่อให้สัตว์กินทางใบปาล์มอย่างเดียวจะทำให้ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ จึงต้องเสริมด้วยอาหารข้น หากนำทางใบปาล์มไปหมักร่วมกับวัตถุดิบที่ให้พลังงาน เช่น กากน้ำตาล ข้าวโพดบด หรือมันสำปะหลังในปริมาณร้อยละ 2-5

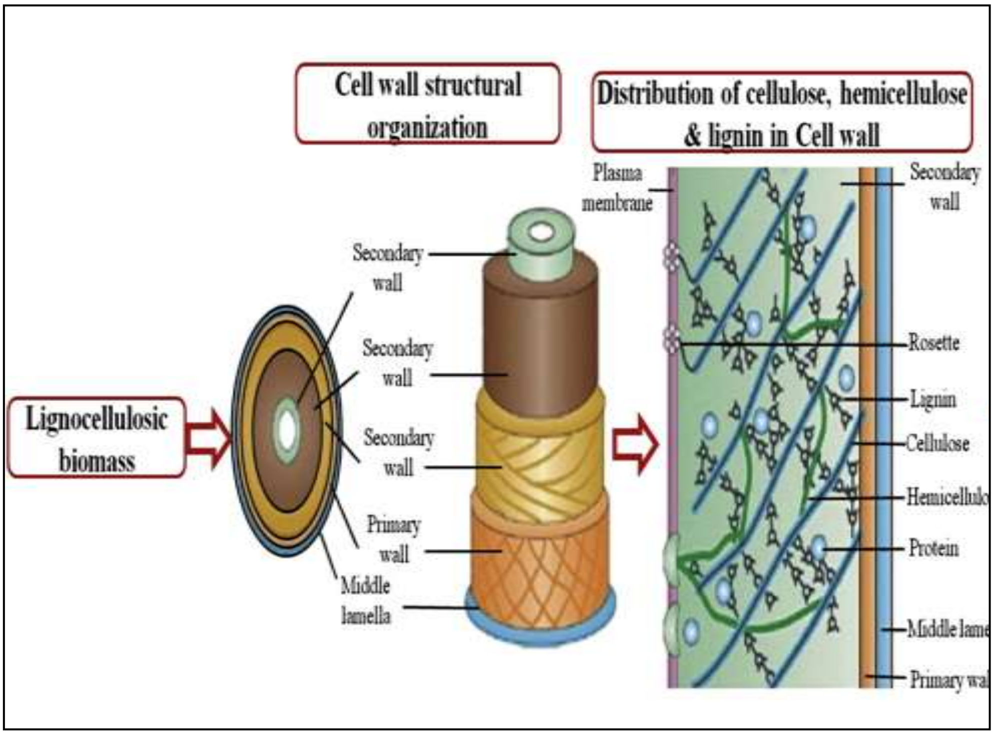
พบว่า จะช่วยปรับปรุงคุณภาพทางเคมี ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้น (สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และคณะ, 2548)

1.2.4 วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส คือ วัสดุเหลือทิ้งที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสจะประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 25-50 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 20-35 และลิกนินร้อยละ18-35 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืช ซึ่งจะประกอบด้วยผนังเซลล์ 3 ชั้น ได้แก่ ชั้น Middle lamella cell wall, Primary cell wall และ Secondary cell wall โดยที่เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบที่พบในผนังเซลล์ชั้น Secondary cell wall ทำหน้าที่ในการป้องกันอันตราย และเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 1.5 (Sanchez, 2009; Menon and Rao, 2012)

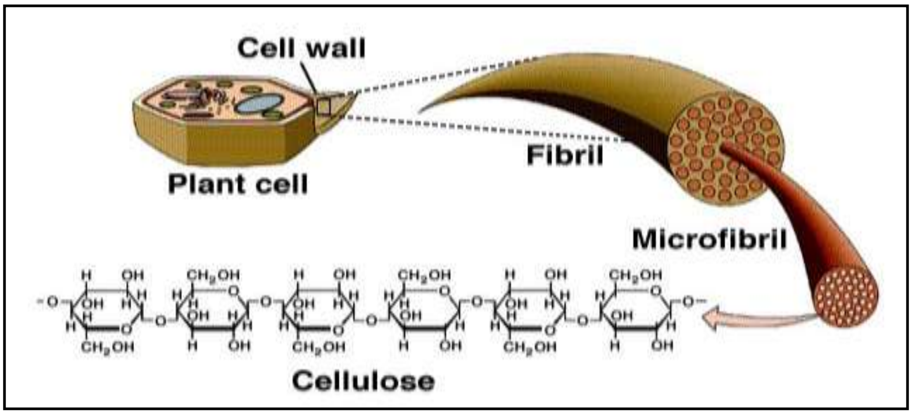
1.2.5 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบที่โมเลกุลมีขนาดใหญ่ เกิดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งแตกต่างกับลิกนิน เกิดจากการสังเคราะห์ของสารจำพวกอะโรมาติกโพลิเมอร์ โดยเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นเส้นตรง ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (D-glucse) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $(C_6H_{10}O_5)n$ เมื่อ n คือ จำนวนหน่วยกลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1.6 ส่วนที่มีโครงสร้างทางเคมี $(C_6H_{10}O_5)_2$ เรียกว่า เซลโลไบโอส ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจำนวน 2 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) ไกลโคซิดิก ประกอบด้วยกลุ่มของแอลกอฮอล์ (COH) 8 โมเลกุล และอีเทอร์ 3 โมเลกุล ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1.7 โดยส่วนใหญ่เซลลูโลสจะอยู่ในรูปของผลึก และมีบางส่วนมีโครงสร้างที่ไม่แน่นอนแต่เป็นส่วนน้อย เซลลูโลสจะถูกย่อยสลายได้ง่าย เมื่อเกิดการย่อยสลายจะได้น้ำตาลกลูโคส (Henriksson *et al*., 2000; Jie *et al*., 2005)



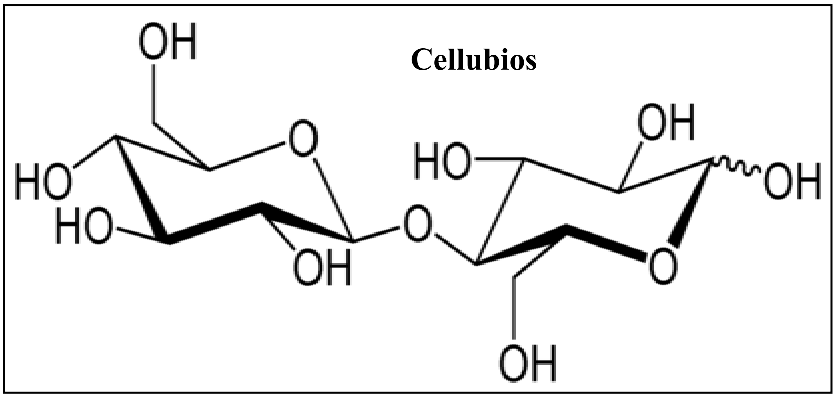
รูปที่ 1.5 องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Menon และ Rao (2012)



รูปที่ 1.6 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

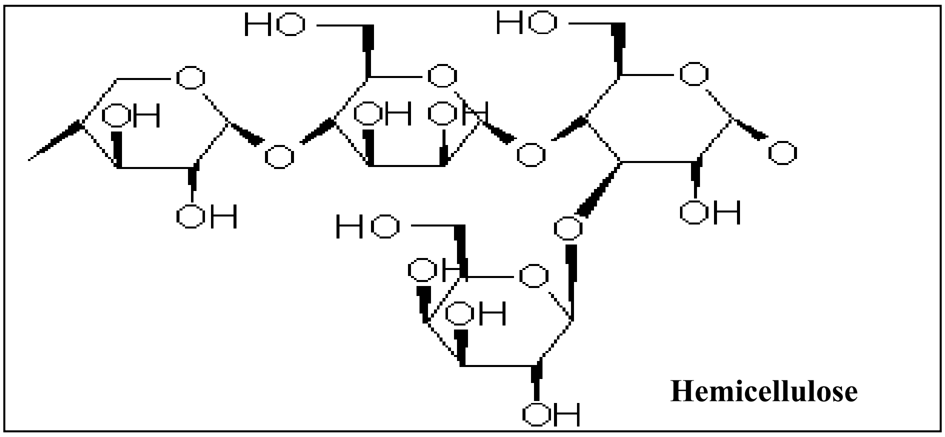
ที่มา: Jie และคณะ (2005)



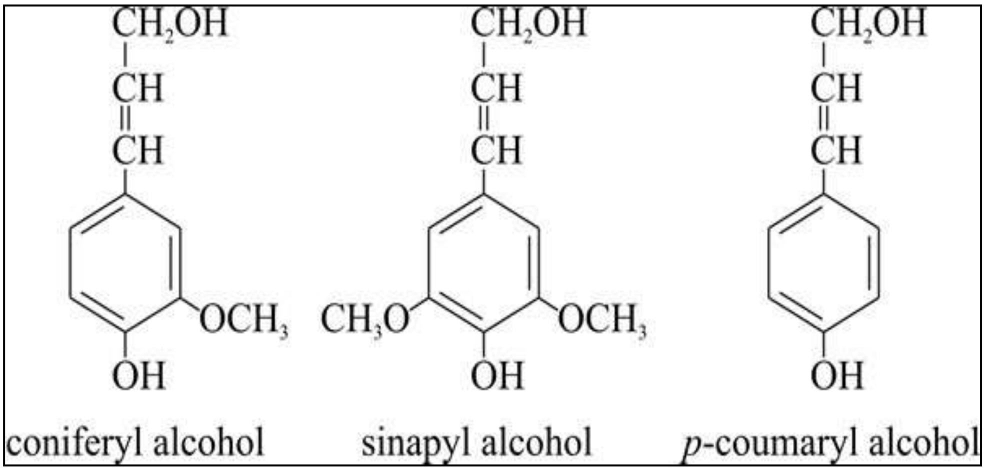
รูปที่ 1.7 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูไบโอส
ที่มา : Henriksson และคณะ (2000)

เฮมิเซลลูโลสเป็นสารโพลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลสโครงสร้างเกิดจากน้ำตาล D-xylose, D-mannose, D-glucose, L-arabinose, 4-O-metyl-glucaronic,D-galacturonic ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) และ β (1-2) ไกลโคซิดิก ความแตกต่างระหว่างเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส คือ เฮมิเซลลูโลสจะมีการแตกกิ่งบริเวณด้านข้างประกอบด้วยน้ำตาลที่ต่างชนิดกัน ส่วนเซลลูโลสจะประกอบด้วย Oligomer ที่ง่ายต่อการย่อยสลายกลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังแสดงในรูปที่ 1.8 (Perez *et al*., 2002)

ส่วนลิกนิก เป็นสารประกอนอะโรมาติก (Aromatic compound) เชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถพบได้ทั่วไปของผนังเซลล์พืช รองลงมาจากเซลลูโลลสและเฮมิเซลลูโลส โดยจะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานเส้นใยเซลลูโลส และ เฮมิเซลลูโลส ทำให้เกิดโครงสร้างที่แข็งแรงของไม้ ลิกนินที่พบในผนังเซลล์จะทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ โดยโครงสร้างของลิกนินจะเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่เรียกว่าฟีโนลิกโพลิเมอร์ (Phenolic polymer) หน่วยย่อยของลิกนินสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Coniferyl alcohol Sinapyl alcohol และ *P*-coumaryl achohol (รูปที่ 1.9) ลิกนินไม่มีสมบัติการยืดหยุ่นและไม่ละลายน้ำ แต่จะสามารถละลายในตัวทำละลายบางชนิด เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เพราะฉะนั้นพืชที่มีองค์ประกอบของลิกนินมากจะมีความแข็งแรงทนทาน ซึ่งองค์ประกอบของลิกนินในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน นอกจากนั้นพืชชนิดเดียวกันแต่มีอายุ และการเจริญในสภาพที่แตกต่างกันก็มีผลทำให้มีองค์ประกอบของลิกนินที่แตกต่างกัน (Menon and Rao, 2012)



รูปที่ 1.8 แสดงโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส
ที่มา: Perez และคณะ (2002)



รูปที่ 1.9 แสดงถึงหน่วยย่อยของลิกนิน
ที่มา : Menon และ Rao (2012)

1.2.6 การย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยเชื้อรา

ปัจจุบันวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสมีจำนวนมากและเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและมีมูลค่าที่ต่ำ ซึ่งวัสดุดังกล่าวสามารถเพิ่มมูลค่าด้วยการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยอาศัยกระบวนการย่อยสลายของจุลินทรีย์ กลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คือ เชื้อรา (Fungi) เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพคือกลุ่มของเห็ด (Basidiomycetes) เช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) และเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) โดยที่เชื้อราเหล่านี้จัดเป็นเชื้อรากลุ่มไวรอท (White rot fungi) มีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสไปเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การย่อยสลายโดยเชื้อราจะเกิดการย่อยสลายทั้งบริเวณภายนอก (Extracellular digestion) และภายในเซลล์ (Intracellular digestion) เนื่องจากรากลุ่มไวรอทสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนิโนไลติก (Ligninolitic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน สามารถแบ่งออกเป็นเอนไซม์ในการย่อยเซลลูโลสได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส เป็นกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์ Endoglucanase เอนไซม์ Cellobiohydrolase และเอนไซม์ β-glucosidase เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบคือ ไซลาเนส ประกอบด้วยเอนไซม์ Endoxylanase เอนไซม์ Exo-xylanase และเอนไซม์ Xylobiase และเอนไซม์ในการย่อยสลายลิกนิน ได้แก่ เอนไซม์ Laccase เอนไซม์ Lignin peroxidase และเอนไซม์ Manganese peroxidase (Rabinovich *et al*., 2004) ดังงานวิจัยของ Haddadin และคณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการหมักกากมะกอกโดยใช้เชื้อเห็ดเห็ดแครงในการย่อยสลายลิกนินในกากมะกอก จากการศึกษาพบว่า เชื้อเห็ดแครงสามารถลดปริมาณลิกนินได้ร้อยละ 53 เมื่อใช้เวลาในการหมัก 40 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การเพาะเห็ดบนวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสเป็นการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสโดยใช้กลุ่มของเห็ด นอกจากนั้นยังเป็นการมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเห็ดสามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยาสูง เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุลิกโนเซลลูโลส ดังงานวิจัยของ Mandeel และคณะ (2005) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดนางรมโดยใช้กระดาษเหลือทิ้งจากเครื่องทำลายเอกสาร (Sheredded officepaper) เป็นวัสดุเพาะ จากการศึกษาพบว่า เห็ดนางรมสามารถเจริญได้เป็นอย่างดี โดยให้ค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยาสูงสุดเท่ากับร้อยละ 109.4 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารในถุงโพลิเอทิลีน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และยังพบว่าเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21-23 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 29-47 ตามลำดับ

1.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเห็ดและการผลิตโพลิแซคคาไรด์

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ (Hetrotroph) จึงจำเป็นต้องอาศัยอาหารสำเร็จรูปจากแหล่งต่างๆ เช่นไม้ผุหรือปุ๋ยหมักเป็นต้น เห็ดบางชนิดมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยอาหารที่อยู่ในรูปเชิงซ้อนจำพวกลิกนิน ฮิมิเซลลูโลส เซลลูโลส ให้อยู่ในรูปที่ไม่ซับซ้อน และง่ายต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ (Philippoussis *et al*., 2007; Lee *et al*., 2008) จากเหตุผลดังกล่าวจึงสามารถใช้วัสดุเพาะเหล่านั้นได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการหมักเสียก่อนหรือหากมีการหมักวัสดุเพาะก็ไม่จำเป็นจะต้องหมักจนวัสดุผุเน่าเปื่อยจนกลายเป็นปุ๋ย เพียงแต่เป็นการหมักเพื่อให้วัสดุมีความอ่อนนุ่ม และเป็นการลดขนาดของวัสดุเพาะทำให้ง่ายต่อการตัดและบรรจุถุง แต่สำหรับเห็ดบางชนิดไม่มีเอนไซม์ในการย่อยสลายวัสดุเพาะ ดังนั้นก่อนนำมาเพาะเห็ดจะต้องทำการหมักวัสดุเพาะ โดยอาศัยกลุ่มของจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติช่วยในการย่อยสลายวัสดุเพาะให้เปื่อยก่อน นอกจากนั้นเห็ดยังต้องการแหล่งไนโตรเจน แหล่งแร่ธาตุอาหารในการเจริญเติบโตซึ่งในการเพาะเห็ดโดยทั่วไปจะมีการเพิ่มแหล่งอาหารเหล่านี้ลงไปเป็นอาหารเสริมเนื่องจากสารอาหารที่มีอยู่ในวัสดุเพาะอาจมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ (วิทยา ทวีนุช, 2552, นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2553)

1.2.7.1 แหล่งคาร์บอน

เห็ดต้องการแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และเป็นแหล่งพลังงานแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ คาร์บอนที่อยู่ในรูปของสารที่ไม่ซับซ้อน ได้แก่น้ำตาลประเภทต่างๆ เช่น ไซโลส อะราบิโนส และ ฟรุกโตส ซึ่งเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ในวัสดุที่ใช้ในการเพาะเห็ดโดยส่วนใหญ่จะเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินโดยอยู่ในรูปของสารเชิงซ้อน ซึ่งเห็ดบางชนิดไม่มีเอนไซม์ในการย่อยสลายสาร ประกอบเหล่านี้ได้จึงจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติในการย่อยสลายจนอยู่ในรูปที่เห็ดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากแหล่งคาร์บอนจากธรรมชาติแล้วแหล่งคาร์บอนสังเคราะห์ก็เป็นอีกแหล่งที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด ซึ่งแหล่งคาร์บอนสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด และผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส ไซโลส ซูโครส กาแลกโตส และฟรักโตส (Cho *et al*., 2006; Pokhrel and Ohga, 2007)

1.2.7.2 แหล่งไนโตรเจน

เห็ดต้องการไนโตรเจนในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก เพื่อใช้ในการเสริมสร้างเซลล์ แหล่งไนโตรเจนที่เห็ดต้องการสำหรับการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์ในการเพาะเห็ดโดยส่วนใหญ่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นวัสดุเพาะ เช่น ต้นข้าวโพด ซังข้าวโพด หญ้า ฟาง ชานอ้อย และขี้เลื่อย ซึ่งสารอาหารไนโตรเจนที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าวจะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต ดังนั้นจะต้องเติมสารอาหารไนโตรเจนในวัสดุเพาะ ซึ่งแหล่งไนโตรที่เติมในวัสดุเพาะนั้นได้มาจาก 2 แหล่งด้วยกัน คือ แหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติ ได้แก่ รำข้าว ถั่วเหลืองป่น ส่าเหล่า และมูลสัตว์ต่างๆ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนจากแหล่งธรรมชาติที่มักถูกใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด และแหล่งไนโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นได้แก่ ยูเรีย แอมโมเนียซัลเฟต และแอมโมเนียคลอไรด์ แต่เนื่องจากเห็ดถูกจัดเป็นพืชชั้นต่ำที่ไม่สามารถนำธาตุอาหารบางอย่างในรูปสารเคมีเอาไปใช้ได้ และสารอาหารบางชนิดนำไปใช้ได้น้อย เช่น ธาตุไนโตรเจน ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน ดังนั้นในการเพาะเห็ดโดยทั่วไปจึงนิยมใช้แหล่งไนโตรเจนจากแหล่งธรรมชาติ (Cho *et al.*, 2006)

วสันณ์ เพชรรัตน์ (2539) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรดในอาหารวุ้น พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ รองลงมา คือ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียซัลเฟต ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Philippoussis และคณะ (2007) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหอมบนวัสดุลิกโนเซลลูโลส 3 ชนิด คือ ขี้เลื่อยไม้โอ๊ก ฟางข้าวสาลี และซังข้าวโพด โดยใช้ถั่วเหลืองป่นเป็นแหล่งไนโตรเจนผสมร้อยละ 4 จากการทดลองพบว่าเห็ดหอมสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยให้ค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยาสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนขี้เลื่อยไม้โอ๊ก เท่ากับ ร้อยละ 41.07 รองลงมา คือ ฟางข้าวสาลี ร้อยละ 73.25 และซังข้าวโพด 80.64 ตามลำดับ

1.2.7.3 แหล่งธาตุอาหาร

เห็ดมีความต้องการธาตุอาหารในการเจริญเติบโตทุกระยะโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเจริญของเส้นใย ธาตุอาหารเหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แหล่งธาตุอาหารที่เห็ดต้องการในปริมาณมากได้แก่ แคลเซียม (Ca) โพแทสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) และแมกซีเซียม (Mg) และแหล่งธาตุอาหารที่เห็ดต้องการในปริมาณน้อยได้แก่ โมลิปตินัม (Mb) โบรอน (B) ทองแดง (Cu) แมงกานิส (Mn) และสังกะสี (Zn) คลอไรด์ (Cl) และอื่นๆ แม้ว่าเห็ดต้องการใช้ในปริมาณที่น้อยแต่จะทำให้เห็ดเจริญเติบโตตามปกติได้ เพราะทำให้กระบวนการทางสรีรวิทยาของเห็ดเป็นไปอย่าง

ปกติ และมีหน้าที่ในการรักษาสมดุลของสารทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (ยงยุทธ โอสถสภา, 2552 ;Pokhrel and Ohga, 2007)

1.2.7.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญเติบโต ระยะเวลาของการเกิดดอก และผลผลิตของเห็ด โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดจะมีความแตกต่างกันทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับเห็ดแต่ละชนิด เช่น เห็ดแครงต้องการอุณหภูมิในระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยเท่ากับ 25-35 องศาเซลเซียส และระยะการเจริญออกดอกเท่ากับ 25-35 (วิทยา ทวีนุช, 2552) ดังข้อมูลในตารางที่ 1.3 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบางชนิด

1.2.7.5 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดโดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ด คือ 7 หรือเป็นกรดเล็กน้อย ในอาหารที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไป เห็ดจะเจริญเติบโตได้เฉพาะเส้นใยเท่านั้น แต่เห็ดไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเห็ดโดยทั่วไป คือ 5.0 -7.6 (วสันณ์ เพรชรัตน์, 2536) ดังเช่นงานวิจัย Pokhrel and Ohga (2007) ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ของเห็ด *Lyophyllum decastes* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวโดยทำการศึกษาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆที่เหมาะสม จากงานวิจัยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด *Lyophyllum decastes* คือ 6-8 และจากงานวิจัยของ Adejoye และคณะ (2007) ศึกษาลักษณะทางกายภาพเคมีต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างระดับต่างๆ จากงานวิจัยพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด คือ 5.5 และ 6.5

1.2.7.6 ความชื้น

ความชื้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด ซึ่งเห็ดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่ขาดน้ำหรือมีความชื้นต่ำ ซึ่งความชื้นแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ความชื้นสัมพัทธ์ และความชื้นในวัสดุเพาะ ในการเพาะเห็ดนั้นความชื้นจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดและการสร้างดอก การเพิ่มความชื้นให้กับวัสดุเพาะสามารถทำได้โดยการรดน้ำ หากมีปริมาณความชื้นมากเกินไปส่งผลทำให้เห็ดเจริญเติบโตช้าลง และอาจทำให้เส้นใยเห็ดเน่าตายได้ แต่หากมีความชื้นน้อยเกินไปเส้นใยไม่สามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้ โดยที่เห็ด

แต่ละชนิดต้องการความชื้นในวัสดุเพาะที่เหมาะสมที่แตกต่างกัน เช่น ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดฟาง คือ ความชื้นร้อยละ 80-90 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดกระดุม คือ ร้อยละ 68-72 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหูหนู คือ ความชื้นไม่ต่ำกว่าร้อยละ 60 และต้องการความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างเช่นเดียวกัน ดังข้อมูลที่แสดงไว้ในตารางที่ 1.2 (วสันณ์ เพรชรัตน์, 2536; วิทยา ทวีนุช 2552)

Shen และคณะ (2008) ศึกษาถึงผลของความชื้นในสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดหอม สารอาหารที่ใช้มีส่วนประกอบดังนี้ ขี้เลื่อยไม้โอ๊ค ร้อยละ 20 ข้าวฟ่างร้อยละ 25 รำข้าวสาลี ร้อยละ 10 ยิบซัม ร้อยละ 0.1 โดยจะทำการศึกษาที่ระดับความชื้นที่ร้อยละ 50, 55 และ60 พบว่าที่ระดับความชื้นร้อยละ 55 ให้ผลผลิตเห็ดหอมสูงที่สุดเท่ากับ 3.2 กิโลกรัมต่อกิโลกรัมวัสดุเพาะ

ตารางที่ 1.3 แสดงอุณหภูมิและแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการออกดอกของเห็ดบางชนิด

ชนิดเห็ด	**อุณหภูมิ(C^o)**		**ระยะเจริญเป็นดอกเห็ด**	
	ระยะเส้นใย	**ระยะออกดอก**	**ความชื้นสัมพัทธ์%**	**แสง**
นางฟ้า	24-28	25-32	70-90	เล็กน้อย
เป๋าฮือ	24-28	28-32	70-90	เล็กน้อย
โคนญี่ปุ่น	24-26	24-30	75-80	เล็กน้อย
หูหนู	28-38	28-35	80-95	เล็กน้อย
เห็ดแครง	25-35	25-35	>90	เล็กน้อย

ที่มา: วิทยา ทวีนุช (2552)

1.2.7.7 แสงสว่าง

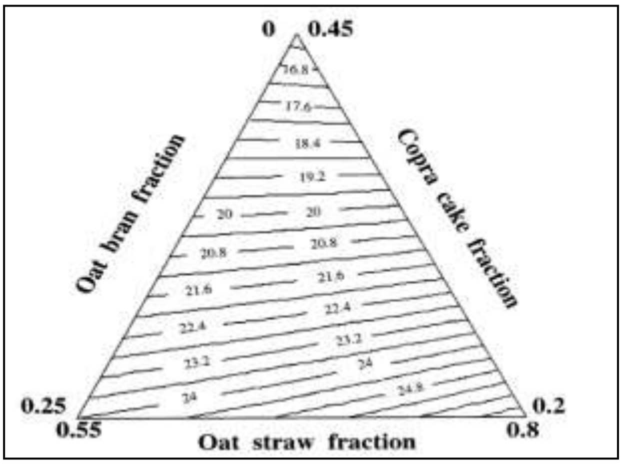
แสงสว่างเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดและการเจริญออกดอก โดยในระยะการเจริญของเส้นใย เห็ดต้องการแสงสว่างในปริมาณน้อย ดังนั้นในระยะนี้จึงต้องบ่มในโรงเรียนที่มืด หรือมีแสงสว่างเล็กน้อยขึ้นอยู่กับเห็ดแต่ละชนิด จนกว่าเส้นใยเห็ดจะเจริญทั่ววัสดุเพาะ และสร้างตุ่มดอก หลังจากระยะนี้เห็ดต้องการแสงเพื่อใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เส้นใยเกิดการรวมตัวและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดหากได้รับแสงที่เพียงพอจะช่วยให้เห็ดออกดอกปริมาณมากและสมบูรณ์ หากเห็ดได้รับแสงสว่างน้อยเกินไป ทำให้หมวกดอกมีขนาดเล็ก ดังนั้นในระยะนี้

จึงจะต้องให้แสงสว่างที่เพียงพอซึ่งเห็ดแต่ละชนิดต้องการปริมาณแสงที่แตกต่างกันในระยะนี้ เรียกว่า ระยะการเปิดดอก (วาริณี ธรรมชาติไพศาล, 2553)

1.2.7.8 อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio)

อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C/N ratio) เป็นสิ่งจำเป็นอย่างหนึ่งในการเพาะเห็ดที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งวัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นวัสดุที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ดังนั้นก่อนที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าว มาเพาะเห็ดจะต้องนำมาแปรสภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพก่อนโดยการนำมาหมักเพื่อให้เห็ดสามารถย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสไปเป็นสารอาหารได้ ดังนั้นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความยากง่ายในการย่อยสลายซึ่งจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายที่สมบูรณ์ ถ้าวัสดุที่ใช้ในการหมักมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงมาก อัตราการย่อยสลายจะเกิดช้า โดยในระยะแรกของการหมักปุ๋ยเพื่อใช้ในการเพาะเห็ดอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะมีค่าสูงเท่ากับ 27:1 แต่หลังจากการหมักปุ๋ยสิ้นสุดแล้ว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนจะลดลงเป็น 17:1 ซึ่งอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ลดลงเป็นอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนทั่วไปที่เห็ดเจริญเติบโตได้ (ทศพร ทองเที่ยง และคณะ, 2549; วิทยา ทวีนุช, 2552; Wu *et al*., 2004)

Cruz และคณะ (1999) ศึกษาวิจัยถึงผลขององค์ประกอบวัสดุเพาะต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมโดยใช้ฟางข้าวโอ๊ก รำข้าวโอ๊ก และกากมะพร้าว ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนด้วยโซเดียมคาร์บอเนต ($NaCO_3$) จากการศึกษาพบว่า เห็ดนางรมเจริญเติบโตได้ดีเมื่อวัสดุเพาะมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนอยู่ในช่วง 16.8-24.8 โดยจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเมื่อวัสดุเพาะมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 22.4-23.2 ดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.10 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุเพาะวัสดุเพาะฟางข้าวโอ๊ก รำข้าวโอ๊ก และกากเนื้อมะพร้าวต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรม

ที่มา : Cruz และคณะ (1999)

1.2.7.9 ภาชนะบรรจุ

ภาชนะบรรจุเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อผลผลิตชีวมวลเห็ดภาชนะบรรจุที่มีความแตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน เนื่องจากหากมีการเพาะเห็ดในภาชนะบรรจุที่มีความเหมาะสมจะมีส่วนทำให้ชีวมวลที่ได้มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เกิดจากการถ่ายเทอากาศ และการระบายอากาศภายในภาชนะบรรจุ และความคงทนของภาชนะบรรจุ ปัจจุบันนิยมใช้ถุงพลาสติกโพลิโพรพิลีน (Polypropylene: PP)ในการเพาะเห็ด เนื่องจากเป็นพลาสติกที่มีคุณสมบัติที่ทนความร้อนสูงได้ดี มีความยืดหยุ่นสูง สามารถเก็บความชื้นได้ดี (รูปที่ 1.11 ก) รองลงมาคือ ถุงโพลิเอทลีน (Polyethylene: PE) เป็นถุงพลาสติกที่มีลักษณะขุ่น มีคุณสมบัติที่ทนร้อนได้น้อยกว่าถุงโพลิเอทลีน เมื่อโดนความร้อนสูงจะเกิดการอ่อนตัวได้ง่าย ซึ่งปัจจุบันนอกจากถุงพลาสติกดังกล่าวแล้วยังมีการใช้ภาชนะบรรจุชนิดอื่นๆมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด เช่น การเพาะเลี้ยงเห็ดฟางในตะกร้า ซึ่งเป็นนวัตกรรมใหม่ในการพัฒนาวิธีเพาะเห็ดฟางเพื่อง่ายต่อการปฏิบัติ ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย ทำให้มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่ให้ผลตอบแทนสูงเนื่องจากการเพาะเห็ดในตะกร้าจะเป็นการเพาะเลี้ยงโดยใช้พื้นที่ในแนวสูงกับแนวราบของพื้นที่ตะกร้าที่เป็นทรงกระบอกประกอบกับตะกร้าจะมีตามีช่องด้านบนซึ่งเห็ดก็สามารถออกได้ และสามารถนำตะกร้าซ้อนกันได้หลายชั้น ทำให้สามารถประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงแบบกอง ซึ่งการเพาะเห็ด

ลักษณะนี้จะช่วยเพิ่มพื้นที่การออกดอก ทำให้การเพาะเลี้ยงเห็ดฟางโดยใช้ตะกร้าให้ผลผลิตประมาณ 9 กิโลกรัมต่อพื้นที่ปลูก 1 ตารางเมตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบกองซึ่งให้ผลผลิต 3 กิโลกรัมต่อพื้นที่ปลูก 1 ตารางเมตร แล้วยังเพาะเลี้ยงซ้ำได้หลายครั้ง (รูปที่ 1.11 ข-ค) กล่องพลาสติก (Plastic Container Box) ก็เป็นอีกภาชนะหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดฟางได้ มีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย มีต้นทุนการผลิตต่ำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเห็ดฟางในตะกร้า (รูปที่ 1.11 ง) และนอกจากนั้นยังมีการประยุกต์ใช้ถุงดำในการเพาะเลี้ยงเห็ดตระกูลนางรม (รูปที่ 1.11 ฉ) และประยุกต์ใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกสูงในการเพาะเลี้ยงเห็ดออริงจิ (รูปที่ 1.11 จ) ซึ่งเห็ดสามารถเจริญเติบโตได้ดี (วาริณี ธรรมชาติไพศาล, 2553; สำเนาว์ ฤทธินุช, 2554; Steamy, 2009; Zen cart, 2012)

1.2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ด

1.2.8.1 อุณหภูมิของการสกัด (Temperature of exrtaction)

อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการสกัดและปริมาณสารที่สกัดได้ ซึ่งเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ อัตราการสกัดและปริมาณสารที่สกัดได้ก็จะสูง เนื่องจากการแพร่ของตัวละลายและตัวทำละลายสูงกว่าเมื่อสกัดที่อุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดจะทำให้มีการชะสารที่ไม่ต้องการออกมาระหว่างการสกัดมากเกินไปและยังก่อให้เกิดการเสื่อมเสียทางเคมีของผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นการสกัดที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะให้สูญเสียตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (เกษม พลายแก้ว, 2553) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 100-121 องศาเซลเซียส (Suwanno *et al.*, 2005; Xujie and Wei, 2008)

1.2.8.2 ระยะเวลาในการสกัด (Exrtaction time)

ระยะเวลาในการสกัดเป็นตัวแปรที่มีอิทธิพลต่ออัตราการสกัดโดยสารของของแข็งจะแพร่เข้าสู่ของเหลวระยะเวลาตั้งแต่เริ่มสัมผัสกันของของแข็งและของเหลว จนถึงความเข้มข้นทั้งสองสถานะมีความเข้มข้นเข้าสู่จุดสมดุล ซึ่งถ้าเวลาน้อยกว่าระยะเวลาที่เข้าจุดสมดุลจะสกัดสารที่สำคัญได้น้อยลง (เกษม พลายแก้ว, 2553) ซึ่งจากงานวิจัยของ Xujie และ Wei (2008) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ด *Bachu* วางแผนการทดลองด้วยวิธี response surface methodology โดยจะทำการทดลองสกัดที่เวลา 2-10 ชั่วโมง จากงานวิจัยพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด คือ 10 ชั่วโมงให้ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์เท่ากับร้อยละ 8.73

1.2.8.3 ตัวทำละลายในการสกัด (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีแยกสารที่เป็นของเหลวปนกับของเหลว หรือของแข็งปนของแข็ง โดยอาศัยสมบัติการละลายของสาร และเป็นการแยกสารที่ต้องการออกจากส่วนต่างๆ ของพืชหรือของผสมที่อยู่ในรูปของแข็ง มีหลักการสำคัญในการสกัด คือ ในขั้นตอนแรกจะทำการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างก่อน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตากแดด การอบ และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง บดตัวอย่างให้ละเอียดเพื่อทำให้มีพื้นที่ผิวมากซึ่งจะสกัดสารออกมาได้มากที่สุด จากนั้นเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในตัวอย่างที่ต้องการสกัดแล้วนำมาเขย่าหรือนำไปต้ม เพื่อให้สารที่ต้องการที่จะสกัดละลายในตัวทำละลาย โดยมีหลักเกณฑ์ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ สารละลายต้องละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี ไม่ละลายสารอื่นๆที่ไม่ต้องการหรือละลายได้น้อยมาก ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการจะแยก ควรแยกออกจากสารละลายได้ง่าย และทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายเพื่อจะได้นากลับมาใช้ใหม่ได้อีก ควรมีราคาถูก และหาได้ง่าย ไม่มีพิษ มีจุดเดือดต่ำ ซึ่งในการสกัดสารบางชนิดจะต้องใช้ตัวทำละลายในการสกัดมากกว่าหนึ่งชนิด และจะต้องทำการสกัดหลายครั้ง เช่น การสกัดปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ เนื่องจากน้ำตาลบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของสารโพลิแซคคาไรด์สามารถละลายได้ดีเมื่อสกัดด้วยด่าง และน้ำตาลบางชนิดสามารถละลายได้ในน้ำดังนั้นเพื่อให้ตัวทำละลายละลายสารที่ต้องการสกัดออกมาได้ทั้งหมดจึงต้องสกัดปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยด่างและน้ำ นอกจากนั้นการสกัดสารจากพืชเพื่อผลิตเครื่องดื่มหรือผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ นิยมใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัด (รานี สุวรรณพฤกษ์, 2550 ; Huang and Liu, 2008)

1.2.8.4 การกวน (Agitation)

การกวนตัวทำละลายในการสกัดเป็นการเพิ่มอัตราการการสกัดเนื่องจากทำให้เกิดการแพร่ในสภาวะปั่นป่วน ทำให้มีอัตราการแพร่ที่สูงขึ้น จึงทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลสารจากผิวสัมผัสของอนุภาคไปยังตัวทำละลายสามารถเกิดได้ดียิ่งขึ้น (รานี สุวรรณพฤกษ์, 2550)

1.2.8.5 ขนาดของอนุภาค (Particle size)

ขนาดอนุภาคเป็นปัจจัยอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อการสกัดโดยหากอนุภาคมีขนาดเล็กจะทำให้พื้นผิวในการถ่ายเทมวลมีมากขึ้นและระยะทางของตัวถูกละลายที่อยู่ภายในของแข็งจะแพร่กระจายสู่ตัวทำละลายได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงขึ้น ดังนั้นก่อนนำตัวอย่างมาสกัดควรทำให้ตัวอย่างมีขนาดเล็กลงก่อน (เกษม พลายแก้ว, 2553) จากการศึกษาวิจัยของ Suwanno และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลของขนาดอนุภาค (Particle

size) ของตัวอย่างเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ต่อการสกัดปริมาณสาร β-1,3-glucan จากการงานวิจัยพบว่า ปริมาณสาร β-1,3-glucan มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 175 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อสกัดจากตัวอย่างที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.2 มิลลิเมตร

1.2.9 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดแครง

1.2.9.1 ลักษณะทั่วไป

เห็ดแครงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Schizophyllum commune* และมีเชื่อทั่วไปว่า เห็ดแก้น เห็ดตามอด เห็ดแต้บ (ภาคเหนือ) และ เห็ดแครง(ภาคใต้)จัดอยู่ในอาณาจักร *Fungi* ดีวิชัน *basidiomycota* ชั้น *basidiomycete* อันดับ *agricales* วงศ์ *Schizophyllaceae* สกุล *Schizophyllum* ชนิด *Schizophyllum commune* มีลักษณะของดอกเห็ดที่เจริญข้างเดียวเป็นรูปคล้ายพัดกว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 1-4 เซนติเมตร ด้านบนมีสีขาวหม่น มีขนละเอียดสีเดียวกัน ด้านล่างมีสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลอมแดง ลักษณะคล้ายครีบแคบเรียวเล็กแยกเป็นแฉกมีรัศมีจากโคนดอกเป็นบางแห่งทำให้มองดูคล้ายตีนตุ๊กแก มีผิวเรียบ ขึ้นเป็นดอกเดี่ยวกระจัดกระจายหรือเป็นกลุ่มซ้อนกันเป็นชั้นๆ บนท่อนไม้มีการดำรงชีวิตแบบผู้ย่อยสลายเจริญทั้งแบบดอกเดี่ยวๆ และเป็นกลุ่มมักขึ้นตามไม้เนื้อแข็งที่ตายแล้ว จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีความชื้นที่เหมาะสม (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2541 อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2546; Aaejoye *et al*., 2007; Kumari *et al*., 2008) รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 1.12 ซึ่งเป็นรูปถ่ายจากสถานที่จริงในแหล่งธรรมชาติ

รูปที่ 1.11 ลักษณะทั่วไปของเห็ดแครง (รูปถ่ายจากสถานที่จริงในแหล่งธรรมชาติ)

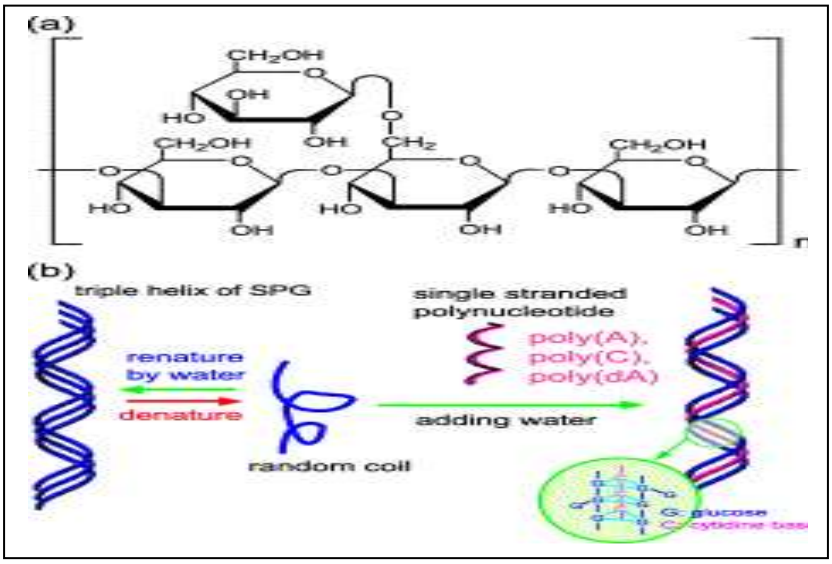
1.2.9.2 คุณค่าทางอาหาร

เห็ดแครงเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดได้แก่ Cystine, Glutamine นอกจากนั้นมีสารอาหารจำพวกโพลิแซคคาไรด์เป็นจำนวนมาก โดยในเห็ดแครง100 กรัมจะมีธาตุเหล็ก 280 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 646 มิลลิกรัม แคลเซียม 90 มิลลิกรัม ไขมันร้อยละ 50 โปรตีนร้อยละ17 และมีตามินบี 2 ที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ ของเอนไซม์หลายชนิดที่อยู่ในรูปของ Flavin mono-nucleotide (FMN) และ Flavin adenine dinucleotide (FAD) โดยที่ FMN จะเกี่ยวข้องกับเมตตาบอลิซึมของกรดไขมัน วิตามินบี 6 ส่วน FAD เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานและการสังเคราะห์ Niacin จากกรดอะมิโน ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยเผาผลาญ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน (Karoline,2006) และจากงานวิจัยของ Lin และคณะ (1990) ที่ศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในเห็ดกินได้ 30 ชนิด พบว่าเห็ดแครงมีกรดอะมิโนชนิด Aspatate, Threonine, Serine, Glutamic acid, Glucin, Amine, Valine, Methionine, Isoleusine, Luecine, Tyrosine, Phenylanine, Lysine, Histidine, Argidine, และProline ในปริมาณร้อยละ 1.02, 0.50, 0.50, 1.26, 0.52, 0.76, 1.04, 0.61, 0.46, 0.74, 0.24, 0.40, 0.60, 0.22, 0.60 และ 0.30 ตามลำดับ

1.2.9.3. คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา

เห็ดแครงนอกจากจะมีคุณค่าทางอาหารสูงแล้วยังมีสารเบต้ากลูแคน (β- glucan) ซึ่ง Shizophyllan ที่มีชื่อเรียกว่า Schizophyllan เป็นสารประกอบของโพลิแซคคาไรด์ เป็นสารที่ไม่มีไอออน ละลายน้ำได้ ประกอบด้วยโซ่ตรงของ β-D-(1-3)-glucopyranosyl และ β-D-(1-6) glucopyranosyl เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ที่เชื่อต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ที่มีลักษณะเป็นวงแหวนไพราโนส (รูปที่ 1.13) เป็นผลผลิตที่ได้จากเห็ดแครง ถูกสร้างขึ้นมาเพื่อเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ มีหน้าที่หลัก คือ การทำให้เซลล์คงรูปร่าง เสริมสร้างความแข็งแรง ป้องกันการแตกของเซลล์ (Osmotic Layer) และทำหน้าเกี่ยวกับกลไกในการคัดกรองสารต่างๆก่อนเข้าสู่เซลล์ (Matsumoto *et al*, 2004; Karinaga *et al.,* 2006) สาร Schizophyllan มีหน้าที่และคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับเรื่องของสุขภาพ มีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้แก่ Sarcoma180, Sacoma37, Ehrich carcinoma โดยสาร Schizophyllan จะไปกระตุ้นการทำงานของ Macrophage ซึ่งมีผลทำให้ T-cell ทำงานได้ดีขึ้น ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ให้เป็นปกติ ในประเทศญี่ปุ่นมีการรักษาคนไข้ที่เป็นโรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหารจำนวน 367 คน โดยใช้สาร Schizophyllan ร่วมกับยา พบว่าจะมีชีวิตยืนกว่าพวกที่รักษาโดยใช้ยาอย่างเดียว และเมื่อใช้สาร Schizophyllan รักษาโรคมะเร็งปากมดลูกร่วมกับ

การฉายรังสี พบว่าคนไข้มีอายุยืนกว่ารักษาด้วยการฉายรังสีถึง 5 ปี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ได้ทำการวิจัยนำสารสกัดจากเห็ดแครงมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวได้ประสบผลสำเร็จ โดยครีมบำรุงผิวจากเห็ดแครงมีคุณสมบัติช่วยให้ความอ่อนโยนต่อผิวหนัง เนื้อครีมจะมีสีขาวนวลและมีความชุ่มชื้นสูง หากมีการใช้อย่างสม่ำเสมอจะช่วยให้ผิวหนังดูอ่อนกว่าวัย และยังสามารถช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังได้ (รื่นฤดี โซ่มงคล และคณะ, 2549; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2553 ; Kitamura *et al*.,1996; Stamets, 2000 ; Kumari *et al*., 2008) นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติในการป้องกัน และลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ โรคเบาหวาน และยังช่วยในการลด Serum cholesterol โดยไปยับยั้ง 3-hydroxy-3-methylglutary coenzyme A ช่วยในการควบคุมปริมาณของอินซูลินให้อยู่ในปริมาณที่พอเหมาะ มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Anti-microbial) ที่สูงกว่าในกลูแคนโดยทั่วไป สาร Schizophyllan ที่สกัดจากเห็ดแครงด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และซีโทนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในหนูทดลอง เช่น *Pseudomonas arruginsen*, *Escherichia coli* (Klaus *et al*., 2011)



รูปที่ 1.12 โครงสร้างทางเคมีของเบต้ากลูแคน (Schizophyllan**)**

ที่มา. Matsumoto และคณะ (2004)

1.2.9.4 คุณค่าทางเศรษฐกิจ

ในอดีตชาวบ้านบริโภคเห็ดแครงเป็นอาหารเท่านั้น ซึ่งเห็ดแครงสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด เช่น แกงคั่ว และแกงกะทิ โดยมีราคาขายเห็ดแครงสดกิโลกรัมละ 80-150 บาท เห็ดแครงแห้งกิโลกรัมละ 400-500 บาท (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2553) และในเห็ดแครงยังพบสาร Schizophyllan ที่สามารถสกัดได้ปริมาณ 8.03 กรัมต่อลิตร จากเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในสภาวะที่มีการเขย่า (Kumari *et al.*, 2008) สำหรับการสกัดสาร Schizophyllan จากเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งนั้นยังไม่พบรายงานการวิจัย สาร Schizophyllan ที่สกัดจากเห็ดแครงมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ ซึ่งปัจจุบันพบว่าเบต้ากลูแคนมีราคาสูง และยังเป็นที่ต้องการของตลาดทำให้ต้องนำเข้า β-glucan จากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท

นอกจากนั้นยังพบว่าในสารสกัดจากเห็ดแครงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทำให้มีการนำสารสกัดจากเห็ดแครงมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิว ซึ่งประสบผลสำเร็จสามารถจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากต่างประเทศ ซึ่งในปีที่ผ่านมูลค่าการนำเข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศมีปริมาณสูงถึง 4,000 ล้านบาท (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2553) และมีความเป็นไปได้ที่จะนำเห็ดแครงไปผลิตเป็นน้ำเห็ดสกัดพร้อมดื่ม เช่นเดียวกันกับน้ำเห็ดสกัดพร้อมดื่มที่สกัดจาก เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู เห็ดหอม และเห็ดหลินจือ ที่ศึกษาวิจัยโดย สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ (2553) จากการศึกษาวิจัยพบว่าน้ำเห็ดสกัดพร้อมดื่มมีสาร β-glucan ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และ มีรสชาติที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยมีค่าการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุดคือ 8.45 เนื่องจากในเห็ดแครงมีสาร β-glucan ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเช่นเดียวกันกับสาร β-glucan ที่สกัดได้จากเห็ดหูหนู เห็ดหอม และเห็ดหลินจือ และเพื่อเป็นการส่งเสริมให้ประชาชนมีการบริโภคเห็ดแครงเพื่อเป็นอาหารสุขภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าทางด้านเศรษฐกิจของเห็ดแครง

เห็ดแครงจึงเป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่มีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อสร้างรายได้เสริมให้กับเกษตรกร เนื่องจากปัจจุบันพบเห็ดแครงน้อยลงในแหล่งธรรมชาติ และมีแนวโน้มที่จะกลายเป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในอนาคต ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อการค้าในปัจจุบันจะนำขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นวัสดุในการเพาะเห็ด แต่ปัจจุบันขี้เลื่อยไม้ยางพารามีราคาสูงถึงตันละ1,500 บาท (สอบถามจากผู้ประกอบการ) ซึ่งส่งผลให้ต้นทุนในการ

ผลิตเห็ดแครงในอนาคตก็จะมีต้นทุนที่สูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นหากมีการวิจัยนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรอื่นๆที่มีมูลค่าต่ำ เช่น ทะลายปาล์มเปล่า ซึ่งมีราคาขายตันละ 200 บาท (สอบถามจากผู้ประกอบการ) และมีปริมาณมากมาใช้เป็นวัสดุในการเพาะเห็ดแครงเพื่อเป็นวัสดุทางเลือกใหม่ทดแทนขี้เลื่อยยางพาราสามารถช่วยลดต้นทุนในการเพาะเห็ดแครงได้

1.3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

3.1 สำรวจ เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์โดยเฉพาะ β-1,3-glucan ที่พบในเห็ดแครงสายพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ โดยเน้นจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง คือ พัทลุง สงขลา และยะลา

1.2.2 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากสายพันธุ์เห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

1.2.3 ศึกษากระบวนการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากชีวมวลเห็ดแครงที่ผลิตได้

1.2.4 ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยเพื่อเพิ่มระดับการผลิตสาร Shizophillan จากเห็ดแครงและการประยุกต์ใช้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 สำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงที่มีแหล่งกำเนิดในพื้นที่ทางภาคใต้ โดยเฉพาะจังหวัดทางภาคใต้ตอนล่างได้แก่ สงขลา พัทลุง และยะลา จำนวนตัวอย่างจังหวัดละ 3 ถึง 5 ตัวอย่างพร้อมทั้งแยกเชื้อเห็ดแครงให้อยู่ในรูปเชื้อบริสุทธิ์

1.3.2 วิเคราะห์สารที่มีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์โดยเน้นที่สารโพลิแซคคาไรด์ในรูปของกลูแคนชนิด β-1,3-glucan (Schizophyllan) จากสายพันธุ์เห็ดแครงที่เก็บรวบรวมได้

1.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากสายพันธุ์เห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน โดยศึกษาปัจจัยของอัตราส่วนผสมระหว่างทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ปริมาณความชื้นของวัสดุเริ่มต้น ค่า C/N ratio ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และภาชนะบรรจุวัสดุเพาะในการหมัก

1.3.4 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากชีวมวลเห็ดแครง โดยที่ระดับอุณหภูมิ 70 ถึง 120 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการสกัด 60 ถึง 120 นาที

บทที่ 2
วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงการผลิตชีวมวล และสารSchizophyllan (β-1,3-glucan) โดยเชื้อเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) โดยดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ซึ่งมีรายละเอียดการวิจัยดังนี้

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุ

2.1.1.1 ตัวอย่างเห็ดแครง

2.1.1.2 ทะลายปาล์มเปล่า

2.1.1.3 ทางใบปาล์มน้ำมัน

2.1.1.4 เมล็ดข้าวเปลือก

2.1.1.5 รำข้าวละเอียด

2.1.1.6 มันเทศ

2.1.2 อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

2.1.2.1 ฟลาส์ก (Flaks)

2.1.2.2 หลอดฝาเกลียว (Screw cap tube)

2.1.2.3 มีดและใบมีดผ่าตัด

2.1.2.4 ปากคีบ (Forceps)

2.1.2.5 Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 และ 0.8 เซนติเมตร

2.1.2.6 จานเลี้ยงเชื้อ (Plate)

2.1.2.7 ขวดดูแรน (Duran)

2.1.2.8 Micro tube (Eppendorf)

2.1.2.9 Pipettes tip ขนาด 200-5,000 ไมโครลิตร

2.1.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

2.1.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina)

2.1.3.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.1.3.3 ตู้บ่ม 25 องศาเซลเซียส (Incubator)

2.1.3.4 Spectro photometer (Shimazu รุ่น UV 1604)

2.1.3.5 Spectro fluorrescence photometer (JASCO รุ่น FP-750)

2.1.3.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

2.1.3.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.1.3.8 Automatic pipette ขนาด 200-5000 ไมโครลิตร

2.1.3.9 Centrifuge

2.1.4 อุปกรณ์อื่นๆ

2.1.4.1 พาราฟิล์ม

2.1.4.2 ถุงพลาสติก Polypropylene

2.1.4.3 กล่อง Polyvinyl chloride

2.1.4.4 ผ้าขาวบาง

2.1.4.5 โกร่งบดยา

2.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.5.1 Potato Dextrose Agar สำเร็จรูป (Difco)

2.1.5.2 Sweet Potato Peptone Vitamin B_6 $CaCl_2$ Dextrose Agar (ภาคผนวก ก)

2.1.6 สารเคมี

2.1.6.1 น้ำตาลเด๊กโตรส	(HiMedia)
2.1.6.2 กรดซัลฟูริก	(Merck)
2.1.6.3 ฟีนอล	(Panreac)
2.1.6.5 ทราย Silicon dioxid	(Sigma-Aldrich)
2.1.6.6 Aniline blue	(Fluka)
2.1.6.7 Glycin	(Fisher Scientific)
2.1.6.8 กรดไฮโดรคลอริก	(Merck)
2.1.6.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์	(Merck)
2.1.6.10 สารมาตรฐาน 1,3-β-D-Glucan	(Fluka)
2.1.4.11 วิตามินบี 6	(HiMedia)
2.1.4.12 แคลเซียมคลอไรด์	(Ajax Finechem Pty Ltd)

2.1.4.13 เปปโตน (Difco)

2.1.4.14 ยูเรีย (Ajax Finechem Pty Ltd)

2.1.4.15 แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ajax Finechem Pty Ltd)

2.1.4.16 แอลกอฮอล์ร้อยละ 90 และ 70 (Merck)

2.2 วิธีวิจัย

2.2.1 การเก็บตัวอย่างเห็ด

เก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงจากแหล่งธรรมชาติโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพัทลุง จะเก็บตัวอย่างจากอำเภอป่าบอน อำเภอตะโหมด และอำเภอป่าพะยอม จังหวัดสงขลาเก็บตัวอย่างจากอำเภอหาดใหญ่ อำเภอนาทวี และอำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดยะลาจะเก็บจากอำเภอเมือง อำเภอรามัน และอำเภอยะหา โดยเก็บตัวอย่างใส่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็งให้ความเย็น ถ่ายรูปเพื่อบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแครงในแต่ละพื้นที่

2.2.2 การแยกเชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์

นำดอกเห็ดแครงสดแช่แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 นาที นำไปล้างในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที ตัดแต่งเนื้อเยื่อเห็ดส่วนที่โดนแอลกอฮอล์ทิ้ง ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 2 x 2 x 2 มิลลิเมตร นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดแล้ววางบนอาหารแข็งพีดีเอ ปิดผนึกจานเพาะเชื้อด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เขี่ยเชื้อบนอาหารชนิดเดียวกันซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) พันฝาหลอดด้วยพาราฟิล์มนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

2.2.3 การทดสอบอัตราการเจริญเติบโต

2.2.3.1) การทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารแข็งพีดีเอ (Potato Dextrose Agar : PDA) เจาะเส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอเป็นเวลา 7 วัน ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นวางลงกลางจานอาหารแข็งพีดีเอ (จานเพาะเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร) บ่มที่สภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 20 วัน

2.2.3.2) การทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี (Sweet Potato Peptone Vitamin B_6 $CaCl_2$ Dextrose Agar:SPBD)

ซึ่งทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.3.1 แต่เปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารแข็งเอสพีบีดี ประกอบด้วย มันเทศ 250 กรัม น้ำตาลเด็กโตรส 20 กรัม เปบโตน 1 กรัม วิตามินบี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม วุ้น 20 กรัม น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ทั้งนี้เพื่อศึกษาศักยภาพการเพิ่มปริมาณของเส้นใย และลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงให้สั้นลง ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 12 วัน

2.2.4 การวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์

2.2.4.1) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เนื่องจากเห็ดแครงสดที่เก็บตัวอย่างในแต่ละพื้นที่มีปริมาณน้อย เมื่อนำไปทำแห้งด้วยวิธี Freezdry ตัวอย่างที่ได้มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์ อีกทั้งเห็ดแครงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติมีการปนเปื้อนของวัสดุอื่น เมื่อนำไปสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ ทำให้มีโอกาสปนเปื้อนสารอื่นได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหารเหลว โดยมีวิธีการเพาะเลี้ยงดังนี้ ใช้ Cork borror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอเป็นเวลา 7 วัน จำนวน 4 ชิ้น ลงในฟลาส์กที่มีอาหารเหลวเอสพีบีดี (SPDB Broth) บรรจุ 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่สภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มฟลากส์ เก็บตัวอย่างกรองด้วยผ้าขาวบาง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตัวอย่างที่ได้นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อสกัด และวิเคราะห์ปริมาณพลิแซคคาไรด์ต่อไป

2.2.4.2) วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์

สกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Suwanno และคณะ (2005) มีวิธีการดังนี้ นำเส้นใยเห็ดแครงที่ผ่านการทำแห้งจำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 120 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาบดโดยเติมทราย (Sea sand) 2 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง บดด้วยโกร่งจนละเอียด เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายใสส่วนที่ 1 และตะกอน เก็บสารละลายใสที่ได้ ส่วนของตะกอนนำมาสกัดต่อโดยเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปรวมกับส่วนใสส่วนที่ 1 ส่วนของตะกอนนำมาสกัดต่อโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1โมลาร์) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ส่วนใสส่วนที่ 2 เก็บส่วนใสที่ได้ ส่วนของตะกอนนำมาสกัดต่อโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1โมลาร์) ปริมาตร 5

มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสที่ได้ไปรวมกับส่วนใสส่วนที่ 2 จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric (Dubois *et al*., 1956) และวิเคราะห์ปริมาณ β-1,3-glucan โดยวิธี Aniline blue (Kauss, 1989 ดัดแปลงโดย Suwanno *et al*., 2007) และ วิธี HPLC (High performance liquid chroma tography) เพื่อหาสายพันธุ์เห็ดแครงในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างที่ให้ปริมาณสารโพลิแซค-คาไรด์ในปริมาณสูง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดแครงสำหรับการทดลองในข้อต่อไป

2.2.5 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์จากสายพันธุ์เห็ดแครง โดยใช้เชื้อเห็ดแครงที่เลือกได้จากข้อ 2.2.4.2 จำนวน 3 ไอโซเลต โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันต่อไปเพื่อศึกษาปัจจัยการเจริญต่างๆ ได้แก่

2.2.5.1) ศึกษาผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยศึกษาอัตราส่วนของทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันตามตารางที่ 2.1 โดยควบคุมความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 80 และใช้เชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 5

ตารางที่ 2.1 อัตราส่วนของวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

สูตรอาหาร	ทะลายปาล์มเปล่า (% dry wt.)	ทางใบปาล์มน้ำมัน (% dry wt.)
Control	100	-
EFB1	90	10
EFB2	80	20
EFB3	70	30
EFB4	60	40

- เตรียมวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าโดยการนำทะลายปาล์มเปล่ามากองสุมและรดน้ำให้ความชื้นเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติช่วยย่อยสลายทะลายปาล์มเปล่าให้อยู่ในสภาพที่เชื้อเห็ดแครงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ตัดให้มีขนาด 2-5 เซนติเมตร (Loss *et al*., 2009) และตัวอย่าง

บางส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนด้วยวิธี Walkley-Black และไนโตรเจนโดยวิธี Photometric Method (Novozamsky *et al*., 1974) ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.2

ทะลายปาล์มหมักเป็นเวลา 1 วัน (ก)

ทะลายปาล์มหมักเป็นเวลา 1 เดือน (ข)

อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส (ค)

วัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า (ง)

รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า

- การเตรียมทางใบปาล์มน้ำมันโดยตัดทางใบปาล์มให้มีขนาด 2-5 เซนติเมตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ (รูปที่ 2.3) ตัวอย่างบางส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจน เช่นเดียวกับทะลายปาล์มเปล่า

ทางใบปาล์มสด (ก)

ตัดให้มีขนาด 2-5 เซนติเมตร (ข)

อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส (ค)

วัสดุเพาะทางใบปาล์ม (ง)

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเตรียมวัสดุเพาะทางใบปาล์มน้ำมัน

-การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น ดัดแปลงจากวิธีของ Philippoussis และคณะ (2001) โดยนำเมล็ดข้าวเปลือก ต้มสุกประมาณ 1 ชั่วโมงจนเมล็ดข้าวเริ่มแตก รอจนเมล็ดข้าวเย็นตัวแล้ว บรรจุลงในถุงพลาสติก (Polypropylene: PP) จำนวน 200 กรัม ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว รอให้เมล็ดข้าวเย็น เจาะเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ (อายุ 7 วัน) จำนวน 4 ชิ้น ด้วย Cork borer (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร) ลงบนเมล็ดข้าวเปลือก นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญทั่วเมล็ดข้าว

-การเพาะเลี้ยงเชื้อบนวัสดุลิกโนเซลลูโลส โดยนำส่วนผสมของสูตรอาหารแต่ละสูตรตามตารางที่ 2.1 ผสมให้เข้ากันปรับความชื้นเท่ากับร้อยละ 80 ด้วยน้ำประปา แล้วแบ่งบรรจุ

ลงในถุงพลาสติก PP ขนาด 5x7 นิ้ว ถุงละ 47.5 กรัม หุ้มปากถุงด้วยคอขวดปิดด้วยจุกสำลีและอะลูมิเนียมฟรอย นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีปล่อยให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกร้อยละ 5 บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน โดยการนำตัวอย่างวัสดุเพาะที่เส้นใยเจริญในตู้บ่มไปอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียสชั่งน้ำหนักวัสดุเพาะที่ผ่านการอบเพื่อหาค่าการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโดยคิดจากค่าผันแปรของน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ ทำการเก็บตัวอย่างจนเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตเต็มวัสดุเพาะ จากนั้นนำไปทำการเปิดดอกเพื่อหาค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา (Biological efficiency: BE) ดังสมการที่ 1 (Shen *et al.*, 2008) มีขั้นตอนในการเปิดดอกโดยการดึงจุกสำลีออก และกรีดถุงเพาะตามแนวตั้งของถุงเพาะกรีดทุกด้านของถุงเพาะ จากนั้นนำไปบ่มต่อในที่ที่มีแสงแดดส่องถึง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะฉีดน้ำทุกๆวัน เพื่อให้ความชื้นแก่เส้นใยเห็ด

$$\text{Biological efficiency \%} = \left\{ \frac{\text{Weight of fresh biomass}}{\text{Weight of dry substrate}} \right\} \times 100 \quad \text{—— (1)}$$

เมื่อ Weight of fresh biomass คือ น้ำหนักดอกเห็ดสด

Weight of dry substrate คือ น้ำหนักแห้งของวัสดุเพาะที่ผ่านการเก็บตัวอย่างเห็ดแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส

- การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในหลอดทดลอง โดยนำส่วนผสมของสูตรอาหารแต่ละสูตรตามตารางที่ 2.1 ปรับความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 80 ด้วยน้ำประปา ลงในหลอดทดลองให้ได้ความยาวของวัสดุเพาะ 9 เซนติเมตร (ชั่งวัสดุเพาะประมาณ 13 กรัม) ปิดด้วยจุกสำลีและอะลูมิเนียมฟรอย ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีปล่อยให้เย็น แล้วถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าว (ใช้เมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อเห็ดแครง 3 เมล็ด) ลงในหลอดทดลอง วัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจากความยาวของเส้นใยเห็ดที่เจริญ โดยจะวัดความยาวทุกๆ 2 วัน จนกว่าเส้นใยเห็ดจะเจริญเต็มหลอดทดลอง

2.2.5.2 การศึกษาผลของความชื้นในวัสดุเพาะเริ่มต้น ปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะที่เลือกได้จากข้อ 2.2.5.1 ที่ระดับความชื้นร้อยละ 80 (ชุดควบคุม) ร้อยละ 70 ร้อยละ 60 และร้อยละ 50 ตามลำดับ เพาะเลี้ยงและเก็บตัวอย่างวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 2.2.5.1

2.2.5.3 การศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) เนื่องจากอัตราส่วนของ C/N เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเส้นใย และการออกดอก ดังนั้นในการทดลอง

นี้จึงศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอัตราส่วน C/N ต่อการเจริญของเส้นใย และการออกดอก โดยกำหนดระดับของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับ 19, 21 และ 23 คำนวณอัตราส่วน C/N ตามวิธีของ Techobanoglous และคณะ (1993) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองได้แก่ รำข้าว ยูเรีย และแอมโมเนียคลอไรด์ (NH_4Cl) ส่วนแหล่งคาร์บอนได้จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของวัตถุดิบเอง (ควบคุมความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ทดลองได้จากข้อ 2.2.5.2) ชุดควบคุมไม่ปรับอัตราส่วนของ C/N เพาะเลี้ยงเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อบนวัสดุลิกโนเซลลูโลส ข้อ 2.2.5.3

2.2.5.4 การศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น เลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.5.3 ศึกษาระดับของเชื้อเริ่มต้น 3 ระดับที่ คือร้อยละ5 (ชุดควบคุม) ร้อยละ 10 และร้อยละ15 ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้

2.2.5.5 การศึกษาผลของภาชนะบรรจุสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง จากข้อ 2.2.5.4 มาศึกษาภาชนะบรรจุวัสดุสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง 2 แบบ คือ ถุงพลาสติก PP (ชุดควบคุม) และกล่องพลาสติก Polyvinyl chloride (PVC) โดยมีขั้นตอนการเพาะเลี้ยงในกล่อง PVC ดังนี้

-การเพาะเลี้ยงเชื้อบนวัสดุลิกโนเซลลูโลสในกล่อง PVC นำส่วนผสมของสูตรอาหารที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ บรรจุลงในกล่อง PVC 100 กรัม ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปิดฝากล่องที่มีการเจาะรูเพื่อให้มีการระบายอากาศภายในวัสดุเพาะ (รูปที่ 2.4ก-ข) บ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เพื่อหาค่าการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด (คิดจากค่าผันแปรของน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ) จนเส้นใยเจริญเต็มวัสดุเพาะ จากนั้นเปิดฝากล่องและบ่มต่อจนเกิดตุ่มดอกเห็ดแล้วนำไปเปิดดอกเพื่อหาค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา คำนวณตามสมการที่ 1 (Shen *et al.*, 2008)

ลักษณะของกล่องที่ใช้ทดลอง (ก)

การเจาะรูที่ฝากล่องเพื่อระบายอากาศ (ข)

รูปที่ 2.3 การเตรียมภาชนะบรรจุในการหมัก

2.2.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดแครงที่เลี้ยงได้โดยวิธีที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.5.5 ใช้วิธีการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Suwanno และคณะ (2005) โดยศึกษา ระดับอุณหภูมิในการสกัด 70, 90, 110 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการสกัด 60, 90, 120 นาที สารสกัดที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Phenol-sulfuric colorimetric (Dubois *et al.*, 1956) วิเคราะห์ปริมาณสาร β-1,3-glucan โดยวิธี Aniline blue (Kauss, 1989 ดัดแปลงโดย Suwanno *et al.*,2007) และ HPLC

2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (Novozamsky *et al.*, 1974) ฟอสฟอรัส (ศรีสม สุวรรณวงศ, 2544) และโพแทสเซียม (ICP-OES) (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553) ในวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่ผ่านการเพาะเห็ดแครงแล้ว

2.2.8 การวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง โดยวิธี LSD (Least Significant Difference) และวิธี T-test

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแครงในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดแครงจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพัทลุง สงขลา และยะลา จังหวัดละ 3 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะของดอกเห็ดแครงมี 2 แบบ คือ แบบที่ดอกเห็ดเจริญเป็นดอกเดี่ยวๆ ได้แก่ ตัวอย่างเห็ดที่เก็บในอำเภอป่าบอน (P1) อำเภอหาดใหญ่ (S1) อำเภอนาทวี (S2) และอำเภอสะบ้าย้อย (S3) ส่วนลักษณะการเจริญของดอกเห็ดแบบที่สอง คือดอกเห็ดมีการเจริญเป็นกระจุกหรือเป็นกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างเห็ดที่เก็บจากอำเภอตะโหมด (P2) อำเภอป่าพะยอม (P3) อำเภอเมือง (Y1) จังหวัดยะลา อำเภอยะหา (Y2) และอำเภอรามัน (Y3) ซึ่งลักษณะของดอกเห็ดทุกแหล่งมีลักษณะคล้ายพัด มีขนาด 1.5-2.5 เซนติเมตร ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาวจนถึงสีน้ำตาล ส่วนด้านล่างของดอกมีสีขาวปนเทา ก้านดอกสั้นมีสีขาวอมเทาจนถึงขาวอมน้ำตาล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงอายุของดอกเห็ด ความชื้น และความอุดมสมบูรณ์ของวัสดุ ชนิดของวัสดุ ได้แก่ ท่อนไม้ และกิ่งไม้ที่เห็ดขึ้นในแต่ละแหล่งด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดแครงในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
อำเภอป่าบอน (P1) จังหวัดพัทลุง		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเดี่ยวๆ -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด มีขนาด 1.4-2.3 ซ.ม. ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาวหม่น ด้านล่างมีสีน้ำตาล ก้านดอก มีสีขาวปนน้ำตาลขนาด 0.6-0.7 ซ.ม.
อำเภอตะโหมด (P2) จังหวัดพัทลุง		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกลุ่ม -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด มีขนาด 1.5-2.0 ซ.ม.ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาวหม่น ด้านล่างมีสีขาวปนเทา ก้านดอก มีสีขาวอมเทา ขนาด 0.4-0.6 ซ.ม.

ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดแครงในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
อำเภอป่าพะยอม (P3) จังหวัด พัทลุง		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกลุ่ม -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด ด้านบนมีสีขาวหม่น มีขนาด 1.3-1.5 ซ.ม. ด้านล่างมีสีน้ำตาล ก้านดอกมีสีขาวอมน้ำตาลขนาด 0.3-0.6 ซ.ม.
อำเภอหาดใหญ่ (S1) จังหวัดสงขลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเดี่ยวๆ - ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด ด้านบนมีสีน้ำตาลปนอ่อน มีขนาด 1.5-2.5 ซ.ม.ด้านล่างมีสีขาวปนน้ำตาล ก้านดอก มีสีน้ำตาลขนาด 0.4-0.7 ซ.ม.
อำเภอนาทวี (S2) จังหวัดสงขลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเดี่ยวๆ -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด มีขนาด 1.3-2.5 ซ.ม. ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาว ด้านล่าง มีสีขาวปนเทา ก้านดอกมี สีเทาเข้มขนาด 0.4-0.6 ซ.ม.
อำเภอสะบ้าย้อย (S3) จังหวัดสงขลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเดี่ยว -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด ขนาด 1.3-2.2 ซ.ม. ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาวหม่น ด้านล่างมีสีน้ำตาล ก้านดอกมีสีน้ำตาลเข้มขนาด 0.2-0.4 ซ.ม.

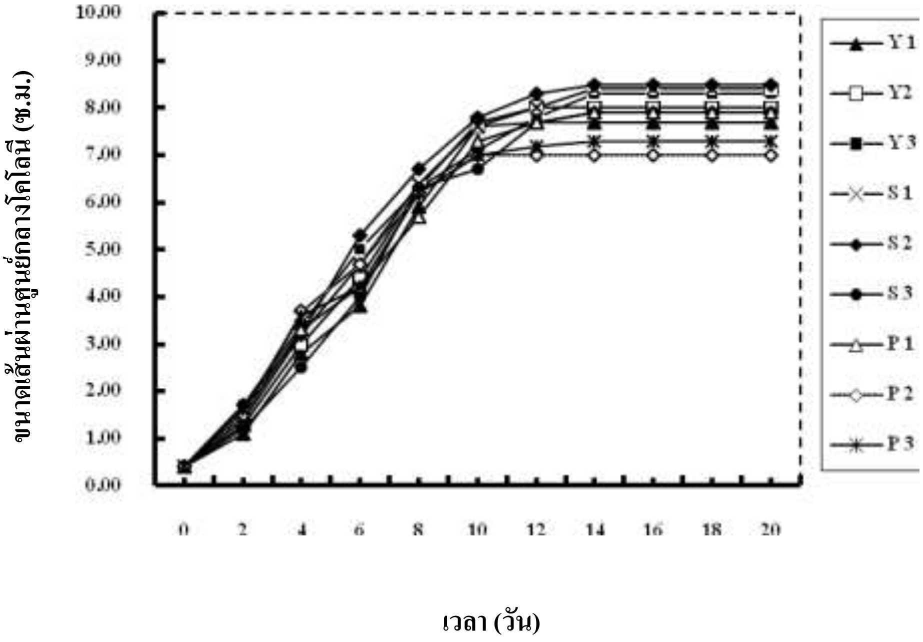
ตารางที่ 3.1 ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดแครงในแต่ละพื้นที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
อำเภอเมือง (Y1) จังหวัดยะลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเป็นกลุ่ม - ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัดมีขนาด 1.5-2.5 ซ.ม.ดอกเห็ดด้านบนมีสีน้ำตาลปนขาว ด้านล่างมีสีน้ำตาลเข้ม ก้านดอกสั้น
อำเภอยะหา (Y2) จังหวัดยะลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบเป็นกลุ่ม - ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัดขนาด 1.5-2.0 ซ.ม. ดอกเห็ดด้านบนมีสีสีขาว ด้านล่างมีน้ำตาล ก้านดอกมีสีน้ำตาลขนาด 0.4-0.6 ซ.ม.
อำเภอรามัน (Y3) จังหวัดยะลา		-ลักษณะการเจริญเติบโตแบบกลุ่ม -ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด มีขนาด 1.3-1.7 ซ.ม. ดอกเห็ดด้านบนมีสีขาว ด้านล่างมีสีขาวปนเทา ก้านดอก มีสีน้ำตาลขนาด 0.3- 0.5 ซ.ม.

3.2 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดแครงที่ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ

จากผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลตที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ดแครง 9 ตัวอย่างที่เก็บในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพัทลุง จังหวัดสงขลา และจังหวัดยะลา โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอเป็นเวลา 20 วัน พบว่าเชื้อเห็ดแครง 3 ไอโซเลต ได้แก่ P2, Y1 และ Y2 มีการเจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดอยู่ในช่วง 7.0-8.0 เซนติเมตร ส่วนเชื้อเห็ดแครง P1, P3, S1, S2, S3 และ Y3 ทุกไอโซเลตจะหยุดการ

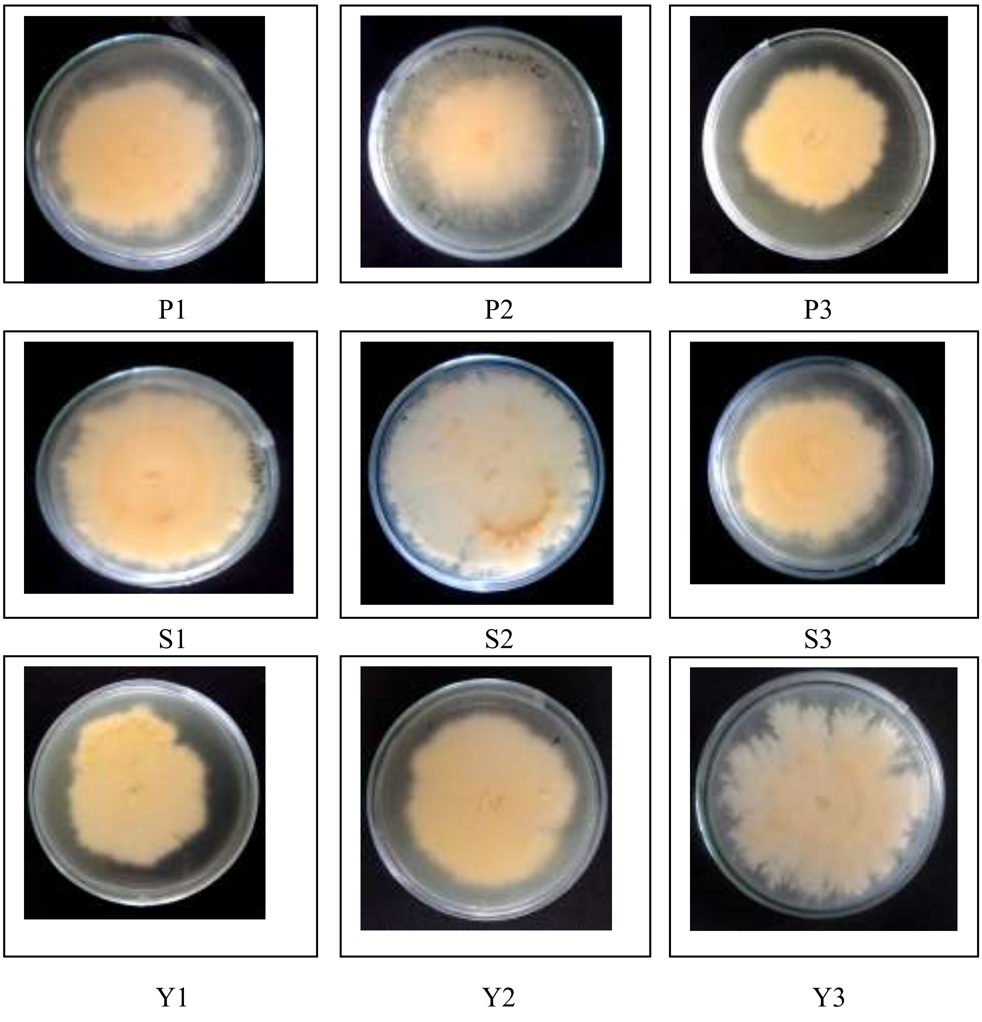
เจริญเติบโตทีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ 14 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีอยู่ในช่วง 7.9 -8.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอใน สภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน

ลักษณะของเส้นใยเห็ดแครงทุกไอโซเลตที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอมีความหนาแน่นเกาะติดบนอาหารเส้นใยมีสีขาวไม่ฟู เส้นใยเห็ดแครงทั้ง 9 ไอโซเลตจะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเพาะ เลี้ยงได้เป็นเวลา 14 วัน เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มขึ้น โดยเริ่มเปลี่ยนจากบริเวณกลางโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน วงสีเหลืองบริเวณกลางโคโลนีจะขยายวงกว้างยิ่งขึ้น และสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเพิ่มขึ้น ยกเว้นเชื้อ S2 เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองโดยเริ่มเปลี่ยนจากตรงกลางโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 3.2) เนื่องจากในกระบวนเจริญเติบโตจะมีการเผาพลาญโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของเส้นใยเห็ด ด้วยการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นคาร์บอนเพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนต่างๆของเซลล์ ซึ่งผลของกระบวนการเมตาบอลิซึมจะทำให้เชื้อปลดปล่อยของเสียออกมา ทำให้เส้นใยเห็ดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2552) นอกจากนั้นพบว่าเชื้อเห็ดแครงทั้ง 9 ไอโซเลตเจริญเติบโตได้ไม่เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่อง จากสารอาหารในพีดีเอ

อาจจะไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครง (Aaejoye *et al*., 2007; Kumari *et al*., 2008) จากรายงานวิจัยของนิภาพร อามัสสา และนิวัฒ เสนาะเมือง (2548) ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารชนิดต่างๆ พบว่าเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงโดยใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน และเพิ่มอาหารเสริม เส้นใยเห็ดแครงจะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ และจากผลการทดลอง พบว่าเชื้อเห็ดแครงที่มีการเจริญเติบโตได้สูงสุดบนอาหารพีดีเอ ได้แก่ เชื้อ S1 , S2 และY3 (พิจารณาจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกับเชื้อเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ (ตารางที่ 3.2) ดังนั้นจึงทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดแครงบนอาหารแข็งเอสพีบีดีในการทดลองข้อต่อไป



รูปที่ 3.2 ลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

ตารางที่ 3.2 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

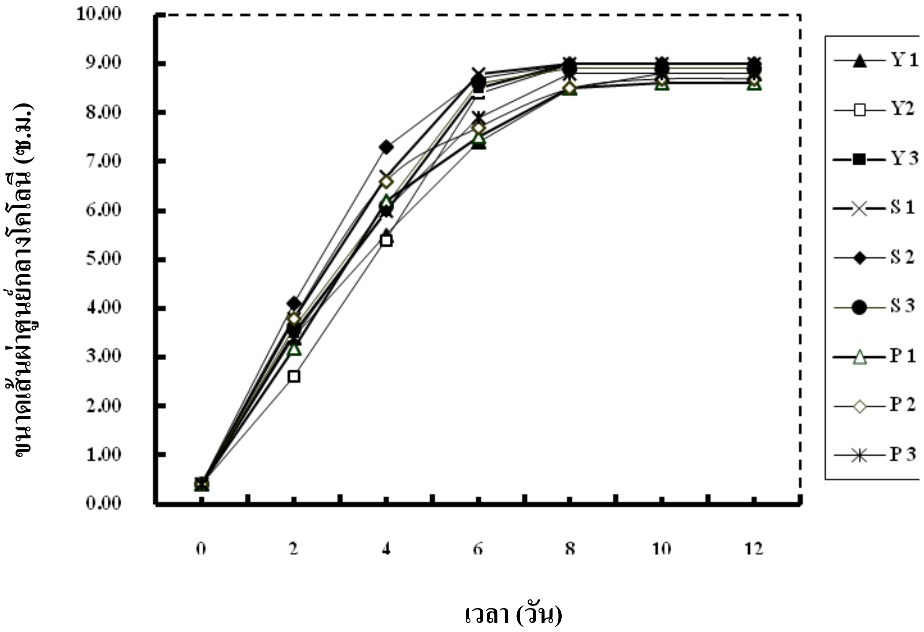
ตัวอย่าง เห็ดแครง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี * (เซนติเมตร)	ความหนาแน่นของเส้นใย**
P1	$7.9^{\text{ข}} \pm 0.2$	++
P2	$7.0^{\text{ง}} \pm 0.0$	++
P3	$7.3^{\text{ค}} \pm 0.1$	++
S1	$8.4^{\text{ก}} \pm 0.1$	+++
S2	$8.5^{\text{ก}} \pm 0.2$	+++
S3	$7.9^{\text{ข}} \pm 0.2$	++
Y1	$7.7^{\text{ข}} \pm 0.3$	++
Y2	$8.0^{\text{ข}} \pm 0.2$	++
Y3	$8.3^{\text{ก}} \pm 0.1$	+++

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ความหนาแน่นของเส้นใยเห็ดแครงสังเกตด้วยตา (+ น้อย ++ ปานกลาง +++ มาก)

3.3 ผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี

จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดีเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตได้ดี โดยเชื้อเห็ดแครงส่วนใหญ่สามารถเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดแครง S1, S2, S3, Y2, Y3 และ P3 อยู่ในช่วง 8.9-9.0 เซนติเมตร (รูปที่3.3) เมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าเชื้อเห็ดแครงทั้ง 6 ไอโซเลตมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \geq 0.05$) ดังข้อมูลในตารางที่ 3.3 อย่างไรก็ตามเชื้อ S1, S2 และ Y3 มีลักษณะเส้นใยที่หนา และฟูมากกว่าเชื้อไอโซเลตอื่นๆ (รูปที่ 3.4) เมื่อนำเส้นใยของเชื้อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงหรือขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนจึงมีโอกาสจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าเช่นกัน (Stamets, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 3.2 ที่เชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดบนอาพีดีเอ และให้ลักษณะเส้นใยที่หนาและฟูเช่นเดียวกัน



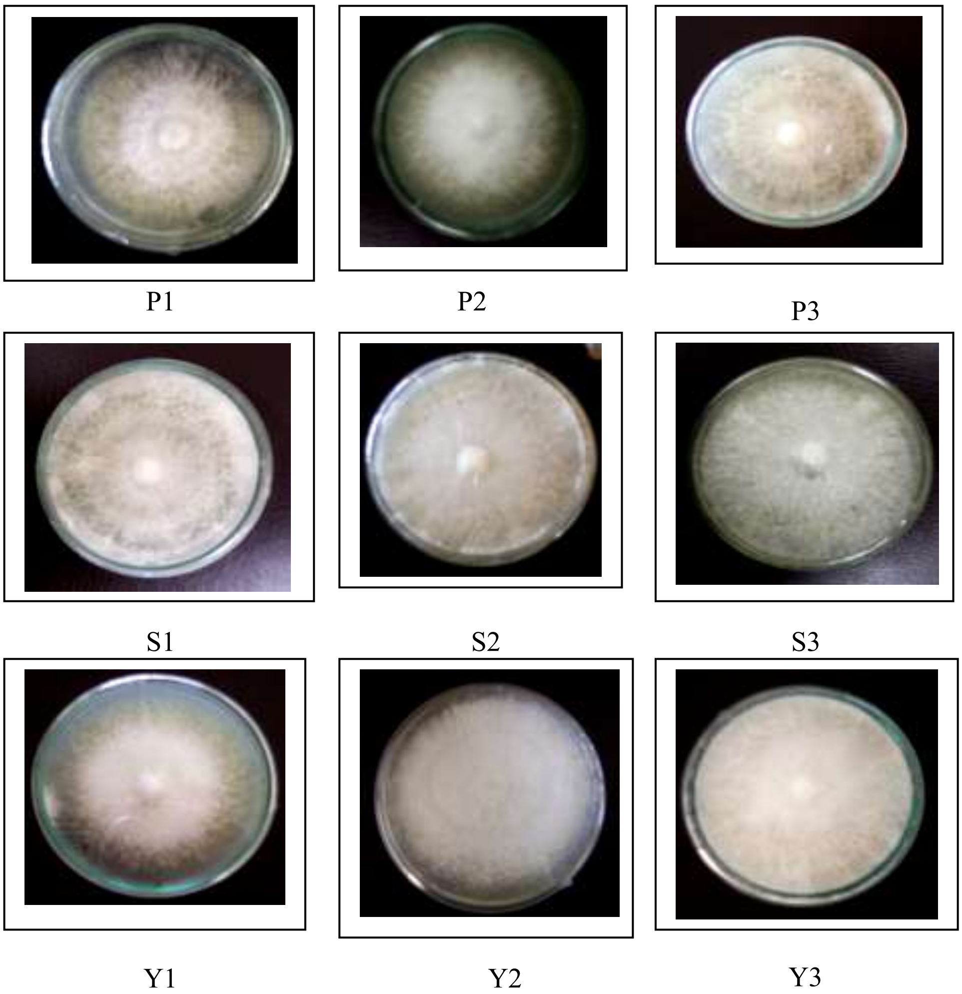
รูปที่ 3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดีในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

ตารางที่ 3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเอสพีบีดีในสภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน

ตัวอย่างเห็ดแครง	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี * (เซนติเมตร)	ความหนาแน่นของเส้นใย**
P1	$8.5^{\text{ข}} \pm 0.3$	+
P2	$8.5^{\text{ข}} \pm 0.4$	++
P3	$8.8^{\text{ก}} \pm 0.3$	++
S1	$9.0^{\text{ก}} \pm 0.0$	+++
S2	$9.0^{\text{ก}} \pm 0.0$	+++
S3	$8.9^{\text{ก}} \pm 0.2$	+++
Y1	$8.5^{\text{ข}} \pm 0.3$	++
Y2	$9.0^{\text{ก}} \pm 0.0$	++
Y3	$9.0^{\text{ก}} \pm 0.0$	+++

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

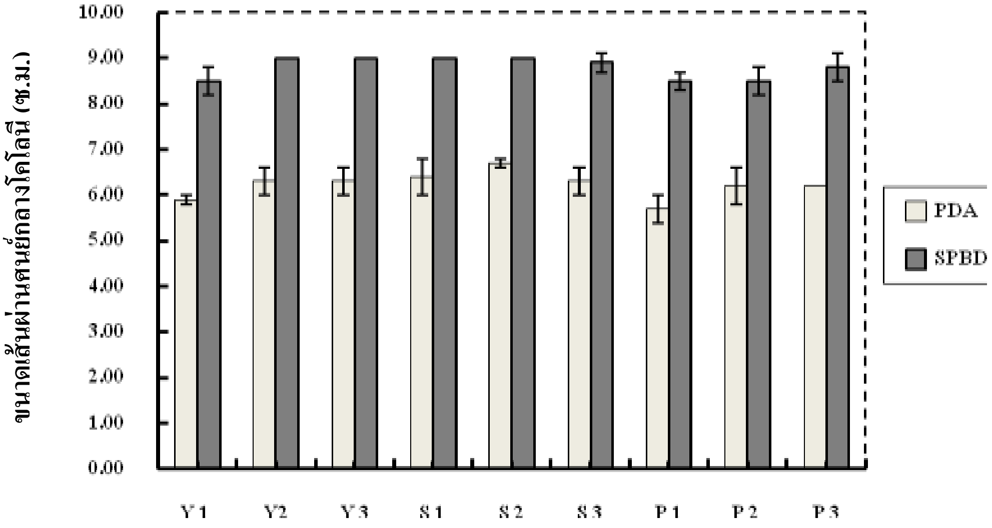
**ความหนาแน่นของเส้นใยเห็ดแครงสังเกตด้วยตา (+ น้อย ++ ปานกลาง +++ มาก)



รูปที่ 3.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี ในสภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน

จากผลการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ และเอสพีบีดี สรุปได้ว่าเส้นใยของเห็ดแครงทั้ง 9 ไอโซเลต ที่แยกจากเชื้อเห็ดแครง 9 ตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ ในจังหวัด พัทลุง สงขลา และยะลา สามารถเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเอสพีบีดี (สูตรอาหารที่ใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน) ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ (รูปที่ 3.5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของนิภาพร อามัสสา และนิวัฒ เสนาะเมือง (2548) ได้ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ พบว่าเห็ดหิ้งที่เพาะเลี้ยงโดยใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเห็ดหิ้งที่เพาะเลี้ยงโดยใช้มันสำปะหลัง รำข้าว และมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้นอาหาร

แข็งเอสพีบีดียังมีส่วนผสมของวิตามินบี 6 แคลเซียมคลอไรด์ และเปปโตน ซึ่งเป็นแหล่งของวิตามิน แหล่งธาตุอาหาร และแหล่งไนโตรเจนที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด (Mao *et al*., 2005; Aaejoye *et al*., 2007) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดีมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า และมีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ



รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอและเอสพีบีดี ในสภาวะมืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 8 วัน

3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan

3.4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างเห็ดแครงทั้ง 9 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดี อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด พบว่าเชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ในช่วง 5.22-6.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (รูปที่ 3.6) โดยที่เส้นใยเห็ดแครง S2 ให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ และสารโพลิแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ได้จากเห็ดแครงมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดหลินจือพันธุ์ลูกผสม 5 สายพันธุ์ ที่ศึกษาวิจัยโดย มุกดา คูหิรัญ และ ปาริชาติ ภูสว่าง (2545)

ซึ่งผลการศึกษา พบว่าปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือทั้ง 5 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 24.78-48.94 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดสมุนไพรชนิดอื่นๆ ได้แก่ เห็ดนางฟ้า, เห็ดหูหนูสีน้ำตาล, เห็ดนางรมฮังการี, และเห็ดเปาฮื้อ ที่ศึกษาวิจัยโดย สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ (2553) พบว่าเห็ดสมุนไพรดังกล่าว มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 0.19-0.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนั้นโพลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดแครงยังมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์(Klaus *et al.*,2011) ดังนั้นเห็ดแครงจึงเป็นเห็ดสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งควรที่จะส่งเสริมให้เพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งของโพลิแซคคาไรด์ เนื่องจากปัจจุบันชาวบ้านบริโภคเห็ดแครงเพื่อเป็นแหล่งของโปรตีนเท่านั้น อีกทั้งเห็ดแครงในแหล่งธรรมชาติก็มีปริมาณน้อยลง ดังนั้นการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อเป็นแหล่งของโพลิแซคคาไรด์ยังเป็นการเสริมรายได้ให้กับเกษตรกรอีกด้วย

จากผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 3.2 และ 3.3 เมื่อทำการทดสอบการเจริญเติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอ และเอสพีบีดี พบว่าเห็ดแครง S2 มีการเจริญเติบโตดีที่สุดเช่นเดียวกันเมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ

ตารางที่ 3.4 ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดี เป็นเวลา 12 วัน ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เชื้อเห็ดแครง	**โพลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**
P1	4.78^{ง}±0.30
P2	3.34^{ช}±0.21
P3	5.24^{ค}±0.51
S1	5.87^{ข}±0.23
S2	6.04^{ก}±0.36
S3	3.60^{ฉ}±0.31
Y1	3.30^{ฌ}±0.23
Y2	4.73^{จ}±0.76
Y3	5.22^{ค} ±0.47

หมายเหตุ 1) ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.4.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Schizophyllan (β-glucan)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ Schizophyllan ของตัวอย่างเห็ดแครง 9 ไอโซเลต (เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดีเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด) ด้วยวิธี Aniline blue และวัดปริมาณสารสกัดด้วยเครื่อง Fluorescence Specto Photometer (JASCO รุ่น FP-750) พบว่าเชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 มีปริมาณ Schizophyllan สูงสุดอยู่ในช่วง 1.68-1.98 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่เชื้อเห็ดแครง S2 มีปริมาณสาร Schizophyllan สูงสุดเท่ากับ 1.98 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเทียบกับเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) แต่สาร Schizophyllan ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Aniline blue มีปริมาณน้อย ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธี HPLC (รุ่น Hewlett-Packard series 1100) พบว่าปริมาณสาร Schizophyllan ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 3.35-4.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยที่เชื้อ S2 มีปริมาณสาร Schizophyllan สูงสุดเท่ากับ 4.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95 ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน ดังข้อมูลในรูปที่ 3.7 ซึ่งสาร Schizophyllan ที่วิเคราะห์ได้ด้วย HPLC มีปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue เนื่องจาก HPLC เป็นเครื่องมือแยกสารประกอบที่มีความแม่นยำและความถูกต้องสูง ซึ่งในการวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้นสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยการฉีดตัวอย่างสารสกัดค่าที่ได้สามารถนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานได้โดยตรง ส่วนการวิเคราะห์ด้วย Aniline blue นั้นจะเป็นการวิเคราะห์สารโดยอ้อมซึ่งสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องเติมสารเคมีเพื่อให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่เติมลงไปให้ได้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารฟลูออเรสเซนก่อนจึงสมารถนำไปวัดค่าได้ ดังนั้นปริมาณสาร Schizophyllan ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC จึงมีปริมาณสูงกว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue

จากการทดลองปริมาณสาร Schizophyllan ที่วิเคราะห์ได้จากเส้นใยเห็ดแครงมีปริมาณที น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารβ-glucan ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์มีปริมาณสารβ-glucan เท่ากับ 130 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง(อธิปัต์ คลังบุญครอง, 2550) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) 47 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (Suwanno *et al*, 2005) และมีปริมาณสารβ-glucan ที่ใกล้เคียงกับเห็ดตระกูลนางรม (*Pleurotus ostreatus, Pleurotus enyngii, Pleurotus pulmunarius*) มีปริมาณสาร β-glucan อยู่ในช่วง 2.2- 5.3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ถึงแม้ว่าเห็ดแครงจะมีปริมาณสาร Schizophyllan ที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับβ-glucan ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ และเห็ดตระกูลหลินจือ ซึ่งสารสกัดβ-glucan ที่ขายและเป็นที่นิยมโดยทั่วไปในรูปของสารสกัดเข้มข้น

และเป็นส่วนส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง และอาหารเสริม เป็นสาร β-glucan ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ และจากเห็ดตระกูลหลินจือเป็นหลัก ซึ่งสารสกัดดังกล่าวมีราคาแพงกลุ่มคนที่สามารถบริโภคได้จึงเป็นกลุ่มคนที่ฐานะดีเท่านั้น แต่เนื่องจากเห็ดแครงเป็นเห็ดที่พบได้โดยทั่วไปในท้องถิ่น มีราคาถูก และมีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่าเห็ดตระกูลหลินจือ ส่งผลให้สารสกัด Schizophyllan ที่สกัดได้จากเห็ดแครงมีราคาที่อาจจะถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาร β-glucan ที่สกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ และเห็ดตระกูลหลินจือ อีกทั้งเห็ดแครงเป็นเห็ดที่สามารถนำประกอบมาอาหารได้หลากหลาย มีรสชาติที่ดี ดังนั้นเมื่อมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับประโยชน์ของสาร Schizophyllan ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเห็ดแครง ส่งผลให้ประชาชนทั่วไปบริโภคเห็ดแครงเพื่อสุขภาพมากขึ้น และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับเห็ดแครงอีกด้วย

ตารางที่ 3.5 ปริมาณสารเบต้ากลูแคน จากตัวอย่างเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดี เป็นเวลา 12 วัน ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 C° โดยวิธี Aniline blue

เชื้อเห็ดแครง	**Schizophyllan (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**	
	HPLC	**Aniline blue**
P1	3.13^{ง} ± 0.18	1.45^{ข} ± 0.20
P2	2.99^{จ} ± 0.03	1.38^{ข} ± 0.06
P3	2.39^{ฌ} ± 0.05	1.32^{ข} ± 0.10
S1	3.92^{ข} ± 0.03	1.92^{ก} ± 0.05
S2	4.20^{ก} ± 0.07	1.98^{ก} ± 0.06
S3	2.44^{ช} ± 0.03	1.02^{ค} ± 0.03
Y1	2.63^{ฉ} ± 0.01	1.34^{ข} ± 0.05
Y2	2.45^{ช} ± 0.10	1.04^{ค} ± 0.08
Y3	3.36^{ค} ± 0.14	1.83^{ก} ± 0.17

หมายเหตุ 1) ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.5. ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง และการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์

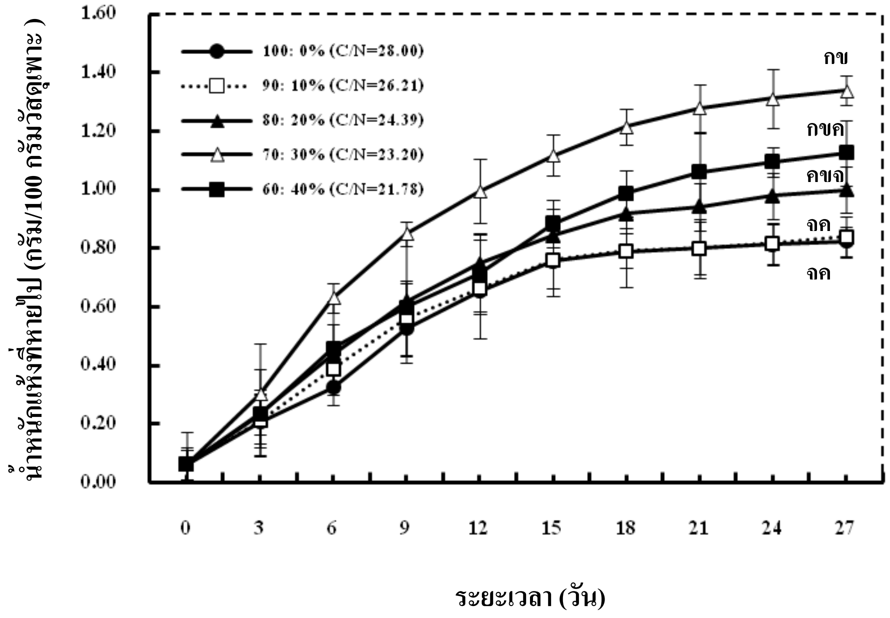
3.5.1 ผลของอัตราส่วนวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 บนวัสดุเพาะทะปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน ในอัตราส่วนผสมต่างๆ คือ 100:0, 90:10, 80:20, 70:30 และ 60:40 พบว่าเส้นใยเห็ดแครง S1 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (คิดจากค่าผันแปรของน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ) เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มอัตราส่วนร้อยละ 70:30 และ 60:40 เป็นเวลา 27 วัน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่มีการผสมอัตราส่วนอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนร้อยละ 70:30 มีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปเฉลี่ยของวัสดุเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.34 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ (รูปที่ 3.8) ส่วนเส้นใยเห็ดแครง S2 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วนร้อยละ 70:30 มีค่าน้ำแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.44 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ (รูปที่ 3.9) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนผสมอื่นๆ และเส้นใยเห็ดแครง Y3 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วนร้อยละ 70:30 และ 60:40 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนผสมอื่นๆ โดยที่อัตราส่วนผสมร้อยละ 70:30 เส้นใยเห็ดแครงมีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะเฉลี่ยเท่ากับ 1.19 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ซึ่งมากกว่าทีอัตราส่วนร้อยละ 60:40 (รูปที่ 3.10) และเชื้อเห็ดแครง S2 มีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเห็ดแครง S1 และ Y3

ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงทั้ง 3 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันทุกอัตราส่วนจะเจริญเติบโตได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3-18 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตคงที่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน จากการสังเกต พบว่าเส้นใยเห็ดจะมีลักษณะที่บางไม่หนาแน่นเจริญเติบโตได้ไม่ทั่ววัสดุเพาะ โดยเส้นใยเห็ดจะเริ่มฝ่อ และเน่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน และเน่ามากขึ้นที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.15 ก) เมื่อนำไปเปิดดอก พบว่าเส้นใยเห็ดแครงไม่เจริญเป็นดอกเห็ด เนื่องจากวัสดุเพาะเห็ดมีความชื้นมากเกินไป ทำให้มีการระบายอากาศในวัสดุเพาะไม่ดี ส่งผลให้เส้นใยเห็ดฝ่อ และเน่าตาย (อัมพา คำวงษา, 2554) จากการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ไอโซเลต มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ไม่ดี ไม่เจริญเป็นออกดอกเมื่อนำไปทำการเปิดดอก จึงทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา (Biological efficiency : BE) ได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันผลการทดลองการ

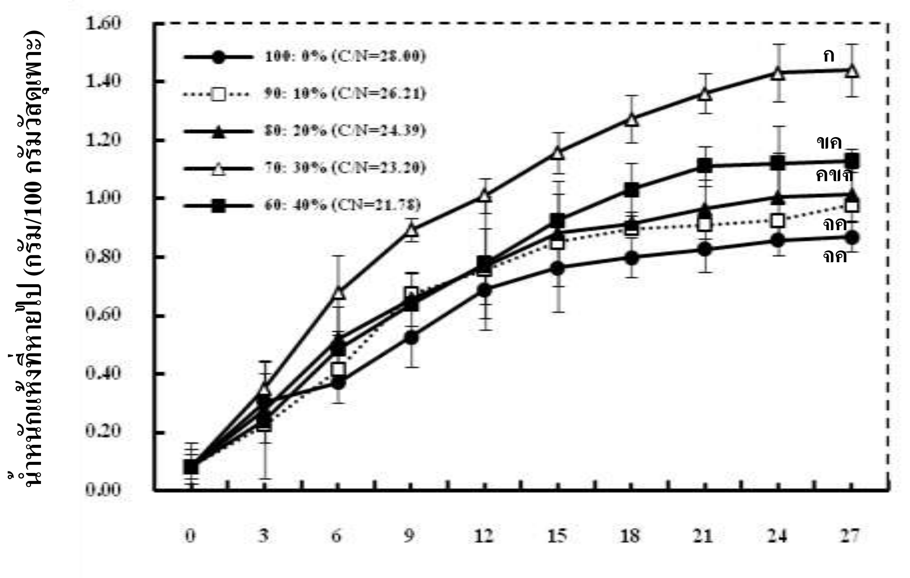
เจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครง โดยวัดจากความยาวของเส้นใยเห็ดที่เจริญเติบโตได้บนวัสดุเพาะใน หลอดทดลอง จากการทดลอง พบว่าเชื้อเห็ดแครงทั้ง 3 ไอโซเลตเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุ เพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันในอัตราส่วนผสมร้อยละ 70:30 โดยที่เชื้อเห็ดแครง S2 มีความยาวของเส้นใยเฉลี่ยเท่ากับ 7.5 เซนติเมตร ซึ่งเจริญได้สูงสุดเช่นเดียวกัน (รูปที่ 3.11-3.13) ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงทุกอัตราส่วนผสมเจริญเติบโตได้ไม่เต็มหลอดทดลอง (9 เซนติเมตร) โดยมีความยาวของเส้นใยที่เจริญบนวัสดุเพาะอยู่ในช่วง 7.3-7.5 เซนติเมตร ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน เนื่องจากความชื้นร้อยละ 80 เป็นความชื้นที่สูงเกินไปทำให้วัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันไม่สามารถดูดซับปริมาณน้ำที่เติมไปเพื่อปรับความชื้นได้ทั้งหมด ทำให้มีน้ำขังรวมอยู่บริเวณด้านล่างของหลอดทดลอง ส่งผลให้เส้นใยเห็ดแครงหยุดการเจริญเติบโต เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตถึงบริเวณดังกล่าว (รูปที่ 3.15 ข)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เชื้อเห็ดแครง S1, S2, และ Y3 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วนผสมร้อยละ 70:30 โดยที่เชื้อเห็ดแครง S2 เจริญเติบโตได้สูงสุดทั้งที่เพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก และในหลอดทดลอง เนื่องจากทางใบปาล์มน้ำมันมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าในทะลายปาล์ม ดั้งนั้นการเติมทางใบปาล์มจะช่วยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้กับวัสดุเพาะ ซึ่งปริมาณไนโตรเจนมีความสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตและสร้างดอกเห็ดโดยที่เห็ดต้องการไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้างโปรตีนภายในเซลล์ นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มความพรุนให้กับวัสดุเพาะ ซึ่งความพรุนมีความสำคัญในการช่วยระบายอากาศให้กับวัสดุเพาะ (ธีระ เอกสมทราเมษ และคณะ, 2551; วิทยา ทวีนุช, 2552) นอกจากนั้นวัสดุเพาะที่ผสมทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วนผสมร้อยละ 70:30 มีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน(C/N) เท่ากับ 23.2 ซึ่งมีรายงานวิจัยถึงอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด พบว่าค่าอัตราส่วน C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดที่สุดอยู่ในช่วง 22.4-23.2 (Cruz *et al.*,1999) เส้นใยเห็ดแครงจึงเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันในอัตราส่วนผสมร้อยละ 70:30 เชื้อเห็ดแครงทั้ง 3 ไอโซเลตเจริญเติบโตได้ไม่ดีทั้งที่เพาะเลี้ยงในถุงและหลอดทดลอง เนื่องจากมีความชื้นสูงเกินไป ดังนั้นในการทดลองข้อต่อไปจึงศึกษาถึงความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง โดยเลือกอัตราส่วนของวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมันร้อยละ 70:30 และเชื้อเห็ดแครง S2



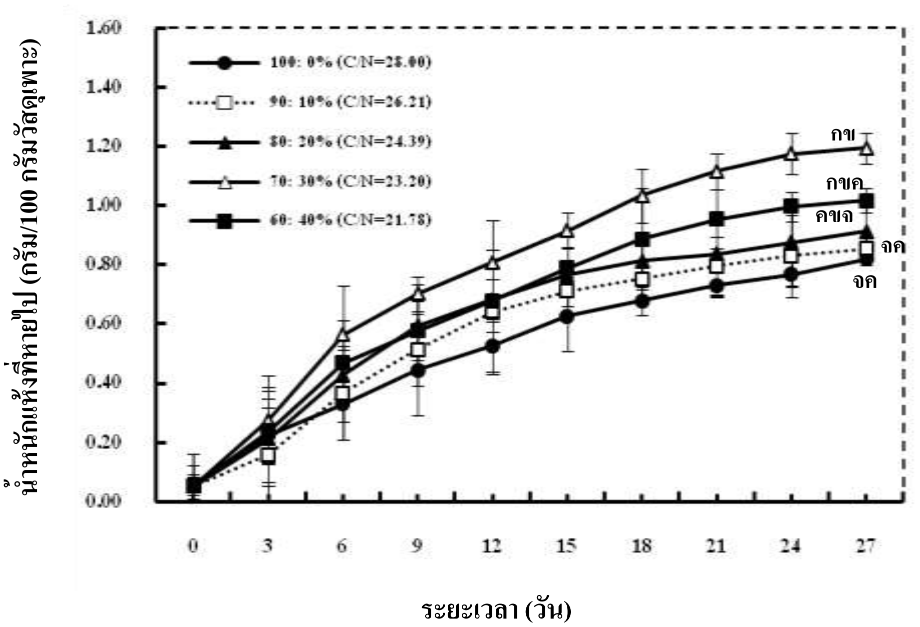
รูปที่ 3.6 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S1 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



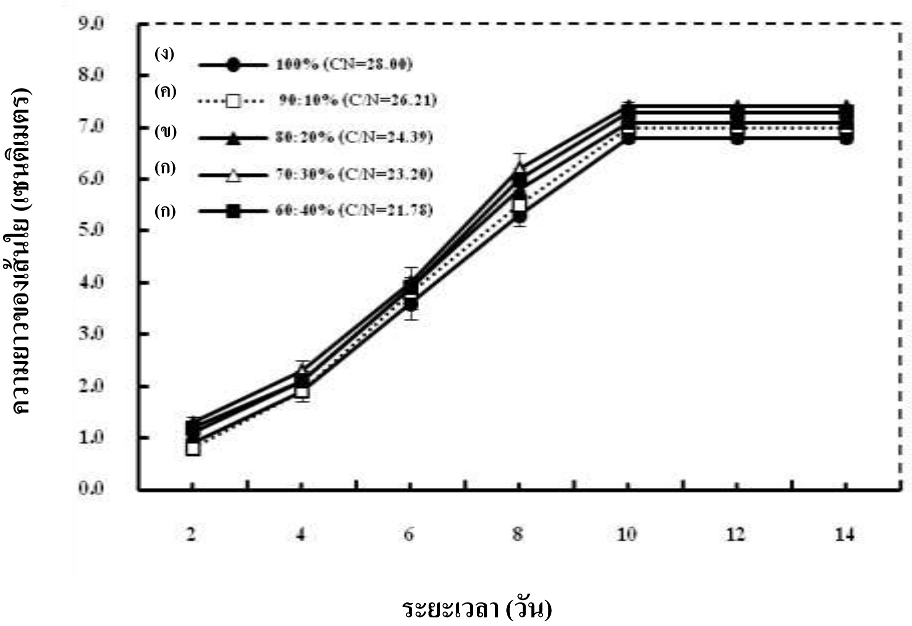
รูปที่ 3.7 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



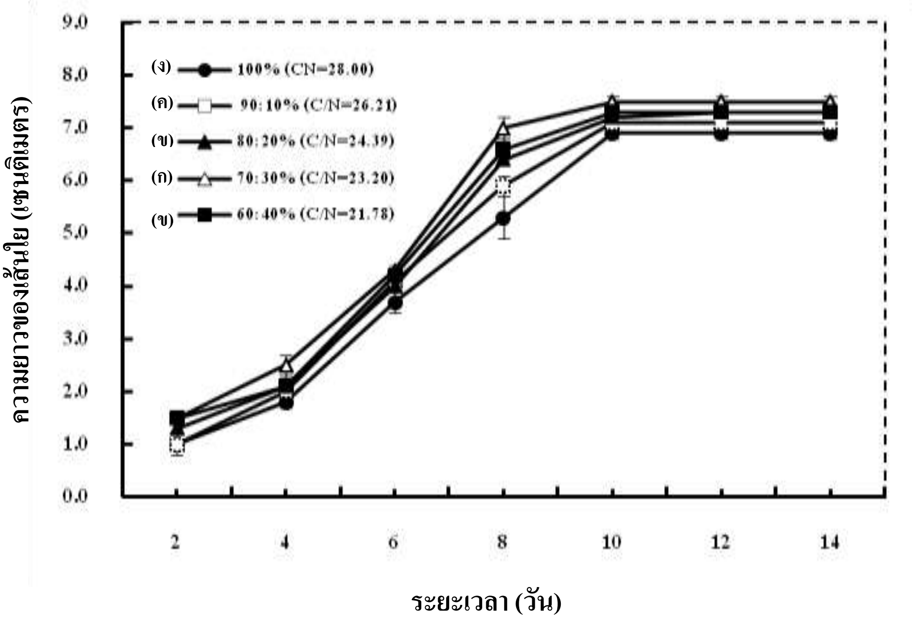
รูปที่ 3.8 น้ำหนักแห้งของที่หายไป วัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง Y3 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



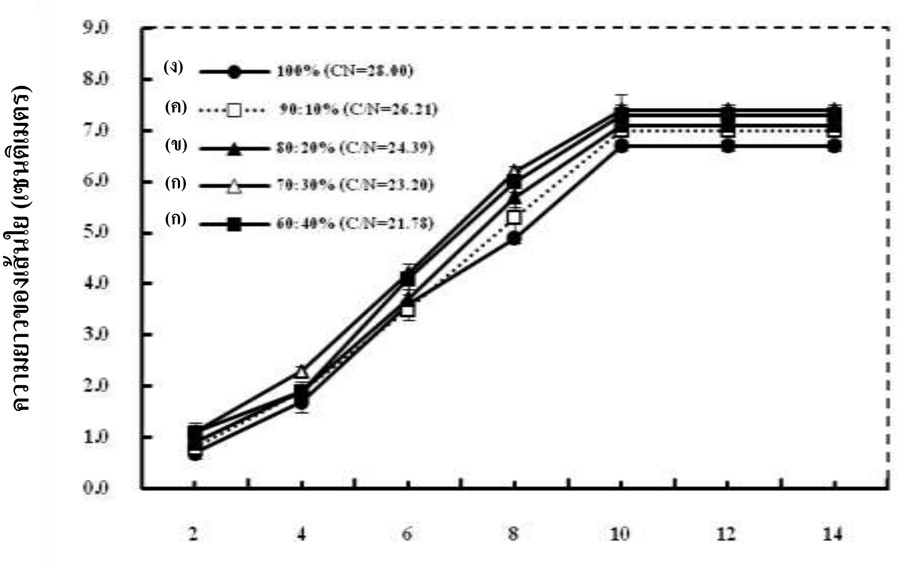
รูปที่ 3.9 ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง S1 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มในหลอดทดลอง อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 3.10 ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 3.11 ความยาวของเส้นใยเห็ดแครง Y3 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

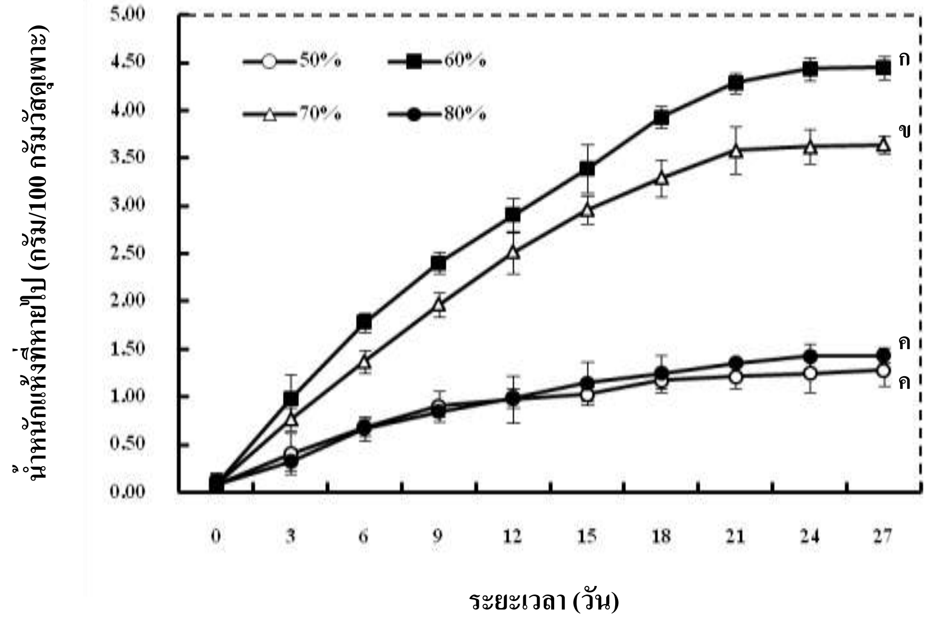
หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ลักษณะเส้นใยเห็ดแครงเพาะเลี้ยงในถุง (ก)   ลักษณะเส้นใยเห็ดแครงเพาะเลี้ยงในหลอด (ข)

รูปที่ 3.12 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มอัตราส่วน 70:30 ความชื้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก (ก) และหลอดทดลอง(ข)

3.5.2 ผลของความชื้นในวัสดุเพาะเริ่มต้นต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง

จากการทดลองในข้อที่ 3.6.1 ผลของอัตราส่วนวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน) ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 80 พบว่าเส้นใยเห็ดเจริญได้ไม่ดีเนื่องจากวัสดุเพาะมีความชื้นสูงเกินไป ดังนั้นในข้อนี้จึงทดลองความชื้นในวัสดุเพาะเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง โดยศึกษาที่ความชื้นร้อยละ50, 60, 70 และ 80 (ชุดควบคุม) จากการทดลอง พบว่าเส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60โดยมีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะเท่ากับ 4.45 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ซึ่งแตกกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50, 70 และ 80 (รูปที่ 3.15) จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shen และคณะ (2008) ศึกษาวิจัยผลของความชื้นในวัสดุเพาะต่อการเจริญของเห็ดหอม (Shiitake) พบว่าเห็ดหอมมีค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยาสูงสุดเมื่อวัสดุเพาะมีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 55-60



รูปที่ 3.13 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์ม (70:30) ปรับความชื้นระดับต่างๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับความชื้นร้อยละ 60 เส้นใยเห็ดแครงจะเจริญได้ทั่วบนวัสดุเพาะเมื่อระยะการเพาะเลี้ยง 23 วัน แต่เส้นใยเจริญได้ไม่หนาแน่น เส้นใยเจริญเป็นย่อมๆ และเกิดตุ่มดอกที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 26 วัน สามารถนำไปเปิดดอกที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 28 วัน เก็บดอกเห็ดทำได้ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 35 วัน มีค่า BE เท่ากับร้อยละ 7.43 ดอกเห็ดที่ได้มีขนาดใหญ่ แต่มีปริมาณดอกน้อย ดอกเห็ดมีก้านดอกสั้น แต่ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ,70 และ 80 เส้นใยเห็ดเจริญได้ไม่ทั่วบนวัสดุเพาะและไม่ออกดอกเมื่อไปทำการเปิดดอก (รูปที่ 3.15) จึงไม่สามารถคำนวณค่า BE ได้ เนื่องจากวัสดุเพาะที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 50 ซึ่งเป็นความชื้นที่น้อยเกินไป ทำให้สารอาหารในวัสดุเพาะละลายได้ไม่หมด เส้นใยเห็ดจึงไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ส่งผลทำให้เส้นใยเห็ดถูกยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนั้นยังทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกไปจากเส้นใยเห็ด (Plasmolysis) ส่วนวัสดุเพาะที่มีความชื้นมากเกินไป (70 และ 80%) จะทำให้มีการระบายอากาศภายในวัสดุเพาะไม่ดี ส่งผลทำให้เกิดการขาดออกซิเจน ทำให้เส้นใยเห็ดฝ่อ และเน่าตาย (วิทยา ทวีนุช, 2552; วาริณี ธรรมชาติ

ไพศาล, 2555) ดังนั้นจึงเลือกความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะเท่ากับร้อยละ 60 เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

ความชื้น 50% (ก)

ความชื้น 60% (ข)

ความชื้น 70% (ค)

ความชื้น 80% (ง)

รูปที่ 3.14 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับความชื้นเริ่มต้นระดับต่างๆ

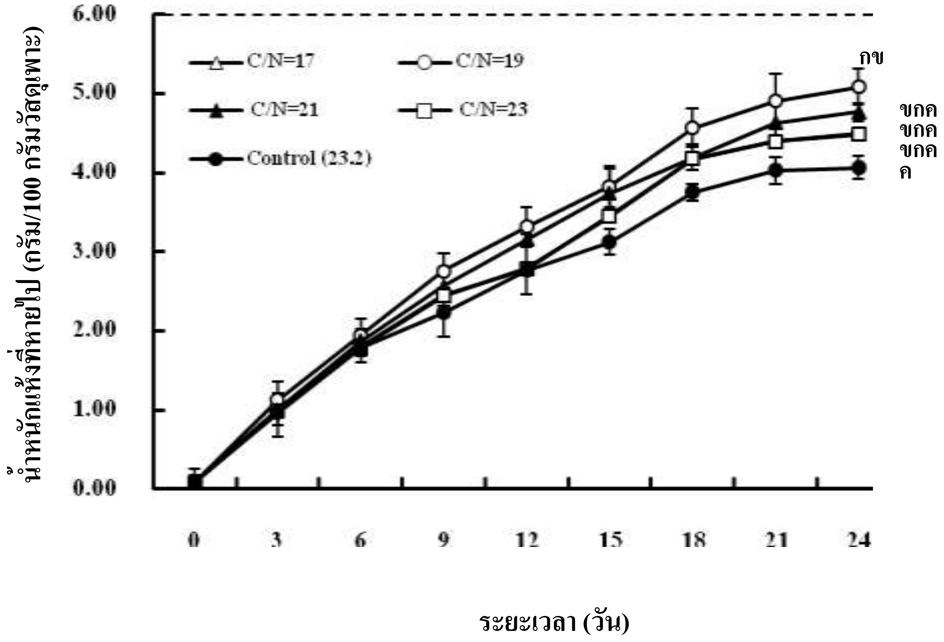
3.5.3 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง

จากการวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนในวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน มีค่าเท่ากับ 22.12 และ 21.28 (% w/w) ตามลำดับ ส่วนปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.79 และ1.33 (% w/w) ตามลำดับ ค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เท่ากับ 28:1 และ 16:1 ตามลำดับ และอัตราส่วน C/N ของวัสดุเพาะทะลายปาล์มต่อทางใบปาล์มที่อัตราส่วนของวัสดุเพาะร้อยละ 70:30 เท่ากับ 23.20 ซึ่งในแผนการทดลองจะปรับอัตราส่วน C/N ให้ได้เท่ากับ 17,19, 21 และ 23 ด้วยยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และรำข้าว คำนวณอัตราส่วน C/N ตามวิธีของ

Tchobanoglous และคณะ (1993) พบว่าวัสดุเพาะที่ปรับค่า C/N ด้วยยูเรีย และรำข้าว เท่ากับ 19 เชื้อเห็ดแครงสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะเท่ากับ 5.09 และ 6.47 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะตามลำดับ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 วัน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ (รูปที่ 3.16, 3.17) ส่วนวัสดุเพาะที่ปรับอัตราส่วน C/N เท่ากับ 17 ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ เท่ากับ 17, 19, 21 และ 23 พบว่าเชื้อเห็ดแครงเจริญได้ดี และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \geq 0.05$) โดยที่การปรับอัตราส่วน C/N ของวัสดุเพาะเท่ากับ 21 เส้นใยเห็ดมีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะสูงสุดเท่ากับ 5.31 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 วัน (รูปที่ 3.18) เนื่องจากแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งคลอไรด์เป็นจุลธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิด และช่วยในกระบวนการเมทาโบลิซึมของเซลล์ คลอไรด์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเกลือคลอไรด์ ดังนั้นหากมีคลอไรด์ปริมาณมากเกินจะเป็นพิษต่อเซลล์ (ยงยุธ โอสถสภา ,2552)

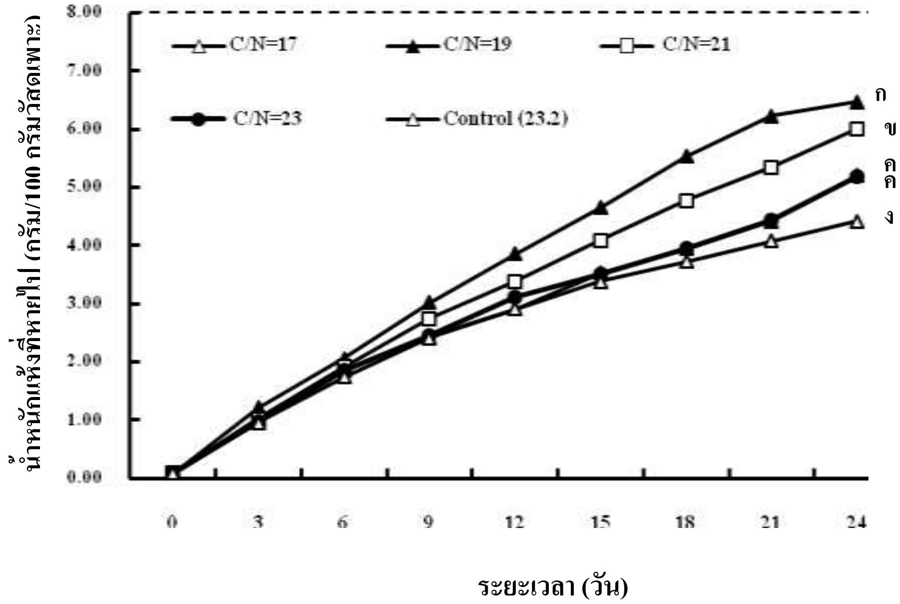
ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับค่าอัตราส่วน C/N ด้วยยูเรีย เส้นใยเจริญได้ทั่ววัสดุเพาะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน เส้นใยเจริญทั่ววัสดุเพาะ และเกิดตุ่มดอกเมื่อเพาะเลี้ยง 24 วัน และเริ่มสร้างดอกเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยง 29 วัน เก็บดอกเห็ดได้เมื่อเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 33 วัน มีค่า BE เท่ากับ 8.96 ดอกเห็ดที่ได้มีขาวนวล มีปริมาณดอกมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ไม่ปรับอัตราส่วน C/N (ตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.19) ส่วนลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับค่าอัตราส่วน C/N ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ เส้นใยเจริญได้ทั่ววัสดุเพาะเมื่อเพาะเลี้ยง 21 วัน เส้นใยเจริญทั่ววัสดุเพาะและเกิดตุ่มดอกเมื่อเพาะเลี้ยง 24 วัน และเริ่มสร้างดอกเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยง 29 วัน เก็บดอกเห็ดได้ที่ระยะเพาะเลี้ยง 32 วัน มีค่า BE เท่ากับ 20.16 (ตารางที่ 3.5, รูปที่ 3.20) และลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว เส้นใยเห็ดแครงสามารถเจริญได้ปกคลุมทั่วบนวัสดุเพาะ เมื่อระยะการเพาะเลี้ยง 19 วัน เกิดตุ่มดอกเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 22 วัน สามารถทำการเปิดดอกที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 24 วัน การเก็บดอกเห็ดทำได้ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 29 วัน มีค่า BE เท่ากับ 31.60 ดอกเห็ดที่ได้มีขนาดของดอกที่ใหญ่ มีสีขาวนวล ปราศจากการปนเปื้อนจากวัสดุอื่น ซึ่งโดยทั่วไปเห็ดแครงจากแหล่งธรรมชาติจะมีการปนเปื้อนจากวัสดุอื่น โดยเฉพาะบริเวณครีบดอก (ตารางที่ 3.6 รูปที่ 3.21) ดอกเห็ดที่ได้ และมีค่า BE มากกว่าเมื่อเทียบกับเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ (ตารางที่ 3.7) เนื่องจากรำข้าวข้าวมีองค์ประกอบของโปรตีน วิตามิน และธาตุอาหาร ซึ่งเป็นสารอาหารที่เห็ดต้องการเพื่อใช้ในการสร้างเส้นใย และสร้างดอกเห็ด การเติม

รำข้าวในวัสดุเพาะเห็ดนอกจากเป็นการเติมแหล่งไนโตรเจนแล้วยังเป็นการเพิ่มสารอาหารอื่นให้กับเห็ดอีกด้วย นอกจากนั้นเห็ดไม่สามารถดูดซึมสารอาหารบางอย่างในรูปของสารเคมีเอาไปใช้ได้ และสารเคมีบางชนิดสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้แต่ในปริมาณน้อย เช่น ธาตุไนโตรเจน ซึ่งเห็ดจะสามารถดูดซึมธาตุไนโตรเจนไปใช้ได้ดีเมื่อธาตุไนโตรเจนอยู่ในรูปของโปรตีนที่มีอยู่ในพืชหรือยีสต์มากกว่าที่อยู่ในรูปของสารเคมี แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับ C/N เท่ากับ 17 ปริมาณเห็ดและค่า BE ที่ได้มีปริมาณน้อย เนื่องจากมีการเติมรำข้าวในปริมาณสูงเกินไปส่งผลให้เกิดสภาวะสารอาหารเกิน ซึ่งเห็ดจะสร้างดอกในขณะที่เส้นใยเจริญได้ไม่เต็มที่ ทำให้ได้ดอกในปริมาณน้อย (วิทยา ทวีนุช, 2552) ดังนั้นจึงเลือกรำข้าวในการปรับ ค่าอัตราส่วน C/N เท่ากับ 19 เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป และการปรับอัตราส่วน C/N นอกจากจะเพิ่มปริมาณของดอกเห็ดที่ได้แล้วยังสามารถลดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงให้สั้นลงอีกด้วย



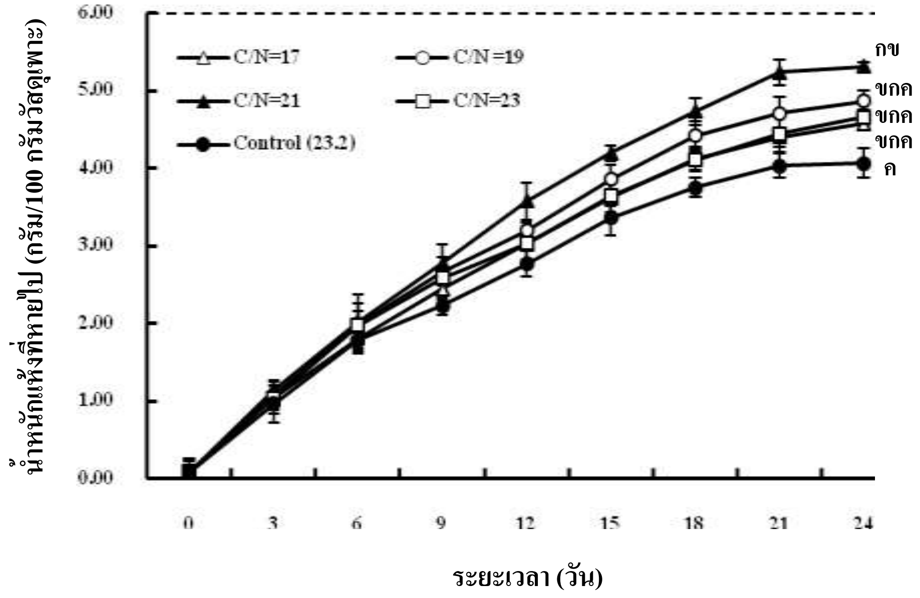
รูปที่ 3.16 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มน้ำมัน และทางใบปาล์ม (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 3.17 น้ำหนักแห้งของที่หายไปวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 3.18 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วนอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3.6 ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย

C/N	**เส้นใยเจริญ (วัน)**	**เกิดตุ่มดอก (วัน)**	**สร้างดอก (วัน)**	**นน.ดอกเฉลี่ย* (กรัม/100 กรัมวัสดุเพาะ)**	**BE%***
Control**	23	26	31	1.05[ง] ±0.0	6.94[ง] ±0.1
17	19	21	25	1.20[ขกง] ±0.3	8.01[ขกง] ±0.2
19	21	24	29	1.35[กข] ±0.7	8.96[กข] ±0.3
21	21	24	29	1.23[ขกง] ±0.1	8.27[ขกง] ±0.4
23	22	24	29	1.22[ขกง] ±0.1	8.09[ขกง] ±0.4

หมายเหตุ * ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ชุด Control = วัสดุเพาะทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30), ความชื้นร้อยละ 60, C/N= 23.20

ตารางที่ 3.7 ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl

C/N	**เส้นใยเจริญ (วัน)**	**เกิดตุ่มดอก (วัน)**	**สร้างดอก (วัน)**	**นน.ดอกเฉลี่ย* (กรัม/100 กรัมวัสดุเพาะ)**	**BE%***
Control**	23	26	31	1.10[ง] ±0.0	7.41[ง] ±0.3
17	19	21	25	1.83[ค] ±0.2	11.94[ค] ±1.0
19	21	24	29	2.94[ข] ±0.1	19.78[ข] ±0.7
21	21	24	29	3.06[ก] ±0.1	20.16[ก] ±0.6
23	21	24	29	1.80[ค] ±0.2	11.78[ค] ±1.0

หมายเหตุ*ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ชุด Control = วัสดุเพาะทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30), ความชื้นร้อยละ 60, C/N= 23.20

ตารางที่ 3.8 ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว

C/N	**เส้นใยเจริญ (วัน)**	**เกิดตุ่มดอก (วัน)**	**สร้างดอก (วัน)**	**นน.ดอกเฉลี่ย*** **(กรัม/100วัสดุเพาะ)**	**BE%***
Control**	23	26	31	1.14[ง]±0.1	7.43[ง] ±0.5
17	17	20	22	2.39[ค]±0.1	15.93[ค]±1.4
19	19	22	24	4.70[ก]±0.4	31.60[ก]±2.5
21	19	22	24	3.66[ข]±0.2	24.68[ข]±2.0
23	19	23	24	2.42[ค]±0.4	16.02[ค]±2.3

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ชุด Control = วัสดุเพาะทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30), ความชื้นร้อยละ 60, C/N= 23.20

ตารางที่ 3.9 ตารางเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยยูเรีย รำข้าว และ NH_4Cl (CN=19)

แหล่งไนโตรเจน	**เส้นใยเจริญ (วัน)**	**เกิดตุ่มดอก (วัน)**	**สร้างดอก (วัน)**	**นน.ดอกเฉลี่ย*** **(กรัม/100 กรัมวัสดุเพาะ)**	**BE%***
Control**	23	26	31	1.05[ง] ±0.0	6.94[ง] ±0.3
รำข้าว	19	22	24	4.70[ก]±0.4	31.60[ก]±2.5
ยูเรีย	21	24	29	1.35[ค] ±0.1	8.96[ค] ±0.4
NH_4Cl	21	24	29	3.06[ข]±0.1	19.78[ข]±0.7

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ชุด Control = วัสดุเพาะทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30), ความชื้นร้อยละ 60, C/N= 23.20

C/N=17

C/N=19

C/N=21

C/N=23

C/N=23.20 (Control)

รูปที่ 3.19 ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย

C/N=17

C/N=19

C/N=21

C/N=23

Control (C/N=23.2)

รูปที่ 3.20 ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl

C/N=17

C/N=19

C/N=21

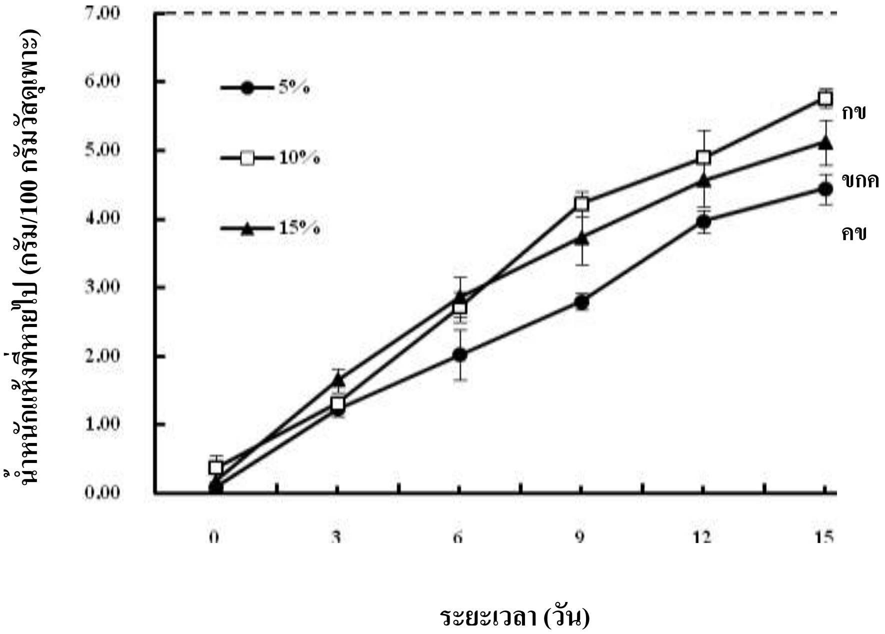
C/N=23

C/N=23.2 (Control)

รูปที่ 3.21 ลักษะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว

3.5.4 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง

จากการทดลองหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครงโดยกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 (ชุดควบคุม) ร้อยละ 10 และร้อยละ 15 พบว่า เห็ดแครง S2 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ10 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 และร้อยละ 15 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะเท่ากับ 5.77 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ (รูปที่ 3.22) ที่ระยะการเพาะเลี้ยง 15 วัน และสามารถเก็บดอกเห็ดได้เมื่อระยะเพาะเลี้ยง 22 วัน มีค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยาเท่ากับ 43.83 ดอกเห็ดที่ได้มีสีขาวนวล ดอกเห็ดมีจำนวนมากกว่าที่เพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 5 (ชุดควบคุม) และร้อยละ 15 (ตารางที่ 3.8, รูปที่ 3.23) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95($p \leq 0.05$) ส่วนที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 15 พบว่าในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 6 วัน เส้นใยมีการเจริญได้ดี แต่การเจริญเติบโตเริ่มลดลงเมื่อระเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในช่วงแรกเส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตได้ดีเนื่องจากมีปริมาณเชื้อมาก แต่เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นการเจริญยิ่งลดลงเนื่องจากสารอาหารมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อที่มีปริมาณมาก ดังนั้นเมื่ออาหารหมดการเจริญเติบโตก็จะยิ่งลดลง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2552) เส้นใยเห็ดจะเจริญได้ทั่ววัสดุเพาะได้เร็วกว่าที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ 5 และร้อยละ 10 เกิดตุ่มดอกและสร้างดอกเห็ดได้ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกันกับที่เพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 แต่หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 19 วัน เชื้อเห็ดแครงเจริญเติบโตได้ช้าลง ทำให้เก็บดอกเห็ดได้ช้ากว่าที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ซึ่งเก็บดอกเห็ดได้เมื่อระยะเวลาเพาะเลี้ยง 25 วัน ในขณะที่เพาะเลี้ยงโดยใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 สามารถเก็บดอกเห็ดได้เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 22 วัน (ตารางที่ 12) ดังนั้นจึงเลือกปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป



รูปที่ 3.22 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3.10 ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ

ปริมาณเชื้อ (%)	**เส้นใยเจริญ (วัน)**	**เกิดตุ่มดอก (วัน)**	**สร้างดอก (วัน)**	**นน.ดอกเฉลี่ย* (กรัม/100 กรัมวัสดุเพาะ)**	**BE%***
Control**	19	22	24	4.50ก±0.4	30.01ก±2.9
10	9	15	19	6.31ข±0.4	42.76ข±0.9
15	7	15	19	4.78ก±0.3	32.56ก±2.7

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

**ชุด Control (5%) = วัสดุเพาะทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน, ความชื้นร้อยละ 60, C/N=19

Control (5%)

ปริมาณเชื้อ 10%

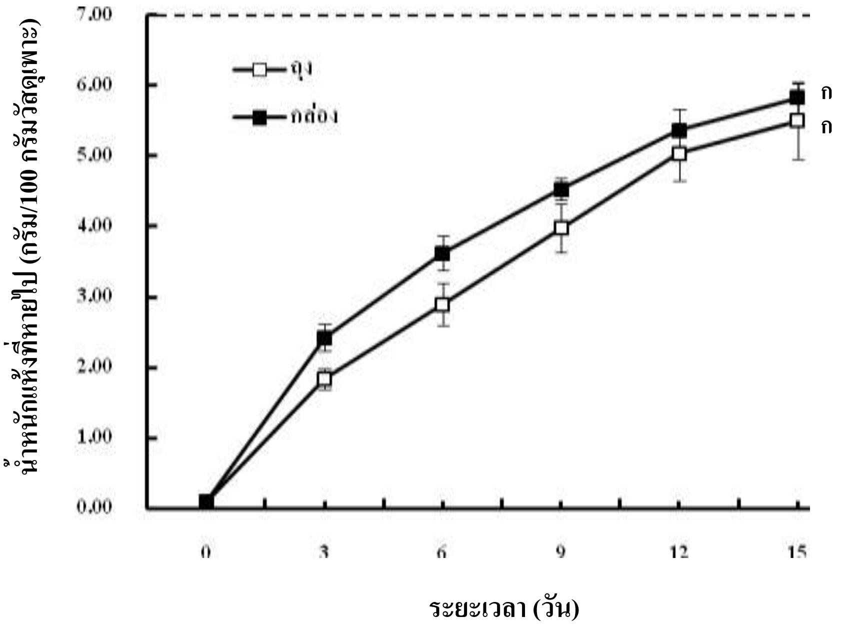
ปริมาณเชื้อ 15%

รูปที่ 3.23 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์ม และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นระดับต่างๆ

3.5.5 ผลของภาชนะบรรจุต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง

การทดลองในข้อนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 ในถุงพลาสติก Polyethylene (PP) และกล่อง Polyvinyl chloride (PVC) โดยเลือสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.9 จากการทดลองพบว่าเชื้อเห็ดแครง S2 เส้นใยเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในกล่อง PVC ได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก PP มีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะที่เพาะเลี้ยงในกล่อง PVC และในถุง PP เท่ากับ 5.83 และ 5.50 กรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \geq 0.05$) ดังรูปที่ 3.24 โดย

ที่เส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในกล่อง PVC สามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่า เมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก PP โดยสามารถเก็บดอกเห็ดได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน มีค่า BE ร้อยละ 46.14 มีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณดอกเห็ด และค่า BE ของเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก PP ซึ่งมีประสิทธิภาพทางชีววิทยาเท่ากับร้อยละ 42.51 สามารถเก็บดอกเห็ดได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน (ตารางที่ 3.9) ลักษณะของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงในกล่อง PVC จะมีลักษณะของดอกเห็ดที่ใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก PP ทั้งนี้เกี่ยวข้องกับพื้นที่ของกล่องต่อการสัมผัสอากาศ และการระบายอากาศภายในกล่อง ซึ่งการเพาะเลี้ยงในกล่องมีพื้นที่สัมผัสอากาศ และมีการระบายอากาศภายในกล่องได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก PP ทำให้เส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตและสร้างดอกเห็ดได้เร็วขึ้น (สำเนาว์ ฤทธินุช, 2554) ลักษณะของดอกเห็ดแครงที่ได้มีขนาดใหญ่ก้านดอกยาวกว่าที่เพาะเลี้ยงในถุงพลาสติก (รูปที่ 3.25) นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงในกล่องยังสามารถช่วยลดการใช้ถุงพลาสติก PP ได้เนื่องจากกล่องที่ใช้ในการทดลองสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายๆ ครั้ง หากเป็นถุงพลาสติกไม่สามารถได้ซ้ำได้ เนื่องจากจะต้องมีการกรีดปากถุงในขั้นตอนการเปิดดอกทำให้มีพลาสติกเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ด ดั้งนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในกล่อง PVC ถือเป็นทางเลือกใหม่ในการเพาะเห็ด



รูปที่ 3.24 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)

ตารางที่ 3.11ระยะเวลาการเจริญ และผลผลิตเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)

ภาชนะบรรจุ	เส้นใยเจริญ (วัน)	เกิดตุ่มดอก (วัน)	สร้างดอก (วัน)	นน.ดอกเฉลี่ย* (กรัม/100 กรัมวัสดุเพาะ)	BE%*
กล่อง (PVC)	7	13	17	12.86 ก ±0.3	46.14 ก ±0.3
ถุง (PP)**	9	15	19	6.24 ข ±0.1	42.51 ข ±1.6

หมายเหตุ *ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ถุง Polyethylene

กล่อง PVC

รูปที่ 3.25 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PP)

3.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan

3.6.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากชีวมวลเห็ดแครง (ดอกเห็ด) ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.6.5 ทดลองที่อุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่ระดับต่างๆกัน คือ อุณหภูมิในการสกัด 70, 90 และ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 60, 90 และ120 นาที จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 60, 90 และ120 นาที ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 12.73, 12.83, และ 12.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.26) ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95 ($p \geq 0.05$) แต่จะแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิอื่นๆ ซึ่งสารโพลิแซคคาไรด์จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงเกินไปปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการชะออกมาของสารโพลิแซคคาไรด์ ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นสารสกัดจะถูกชะออกมามากขึ้น แต่หากอุณหภูมิที่สกัดสูงเกินไปจะส่งผลให้สารที่ต้องการสกัดเสียสภาพ และทำให้สารรบกวนถูกชะออกมาในปริมาณมาก ทำให้สารที่ต้องการสกัดได้ปริมาณน้อย และระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อการสกัดสารเนื่องจากระยะเวลาการสกัดเกี่ยวข้องกับการสัมผัสระหว่างตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกับตัวอย่างที่ต้องการสกัด ตั้งแต่เริ่มสกัดจนถึงจุดสมดุลของระยะเวลาในการสัมผัส โดยหากเวลาในการสัมผัสน้อยกว่าจุดสมดุลสารสกัดจะถูกชะออกมาน้อย ทำให้ได้สารสกัดที่ต้องการในปริมาณน้อย หากเลยจุดสมดุลสารสกัดจะถูกชะออกมาไม่ได้มากกว่าจุดสมดุล (Shi *et al.,*1996; Kim and Huang, 2003)

ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ สามารถช่วยประหยัดพลังงาน และระยะเวลาในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ได้ ซึ่งจากเดิมสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 120 นาที (ชุดควบคุม) ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 60 นาที ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้มีปริมาณสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 120 นาที (ชุดควบคุม)

ตารางที่ 3.12สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างเห็ดแครง ทีเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

อุณหภูมิ/เวลา องศาเซลเซียส/นาที	**โพลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**
70/60	10.42^{จ}±0.2
70/90	10.72^{จ}±0.5
70/120	11.08^{งค}±0.4
90/60	11.32^{งค}±0.5
90/90	11.73^{คขง}±0.4
90/120	11.79^{ขค}±0.7
110/60	12.73^{ก}±0.2
110/90	12.81^{ก}±0.5
110/120	12.93^{ก}±0.3
120/120 (control)	11.83^{ขค}±0.4

หมายเหตุ 1) ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.6.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร Schizophyllan

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร Schizophyllan จากชีวมวลเห็ดแครงที่อุณหภูมิและเวลาในการสกัดระดับต่างๆ วิเคราะห์ปริมาณสาร Schizophyllan ที่สกัดได้ด้วยวิธี Aniline blue พบว่าปริมาณสาร Schizophyllan มีปริมาณสูงสุด เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 และ 120 นาที ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95 ($p\geq0.05$) แต่จะแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับที่สกัดด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาอื่นๆ โดยมีปริมาณสาร Schizophyllan เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 และ 120 นาที เท่ากับ 4.19 และ4.38 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3.27) จากการทดลองเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดสูงขึ้นปริมาณสาร Schizophyllan ที่สกัดได้ก็จะมากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 120 นาที ปริมาณสาร Schizophyllan ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 และ 120 นาที ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิและ

ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อการถูกชะออกมาของสารสกัด แต่หากอุณหภูมิในการสกัดสูงเกินไปจะทำให้สารที่ต้องการสกัดเสียสภาพ(Shi *et al.,*1996; Kim and Huang, 2003) ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณสาร Schizophyllan ด้วยวิธี Aniline blue พบว่าปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณน้อย ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLCซึ่งเป็นเครื่องมือแยกสารประกอบที่มีความแม่นยำและความถูกต้องสูง และสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลายชนิด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่าปริมาณสาร Schizophyllan มีปริมาณสูงสุด เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 120 นาที เท่ากับ 9.31 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ95 ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 120 นาที ปริมาณสาร Schizophyllan ที่สกัดได้มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 และ 120 นาที เช่นเดียวกันกับที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue ดังนั้นผลจากการศึกษาจึงสามารถช่วยประหยัดพลังงานในการสกัดปริมาณสาร Schizophyllan โดยการลดอุณหภูมิในการสกัดเช่นเดียวกันกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์

ตารางที่ 3.13 สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเบต้าจากตัวอย่างเห็ดแครง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธี aniline blue

อุณหภูมิ/เวลา องศาเซลเซียส/นาที	**Schizophyllan (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**	
	HPLC	**Aniline blue**
70/60	$5.12^{\text{ช}} \pm 0.18$	$2.42^{\text{จ}} \pm 0.21$
70/90	$5.35^{\text{ช}} \pm 0.04$	$2.74^{\text{ง}} \pm 0.13$
70/110	$5.54^{\text{ช}} \pm 0.01$	$2.86^{\text{ง}} \pm 0.15$
90/60	$6.30^{\text{ฉ}} \pm 0.03$	$3.13^{\text{ค}} \pm 0.18$
90/90	$6.46^{\text{ฉ}} \pm 0.04$	$3.36^{\text{ค}} \pm 0.08$
90/110	$6.78^{\text{จ}} \pm 0.15$	$3.39^{\text{ค}} \pm 0.15$
110/60	$7.19^{\text{ง}} \pm 0.07$	$3.87^{\text{ค}} \pm 0.07$
110/90	$8.71^{\text{ข}} \pm 0.20$	$4.09^{\text{ก}} \pm 0.20$
110/110	$9.31^{\text{ก}} \pm 0.08$	$4.38^{\text{ก}} \pm 0.08$
120/120 (control)	$8.90^{\text{ค}} \pm 0.11$	$3.88^{\text{ข}} \pm 0.11$

หมายเหตุ 1) ตัวอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง และการผลิตสาร Schizophyllan ตั้งแต่ขั้นตอนการคัดแยกเห็ดแครงให้อยู่ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ การทดสอบการเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงบนวัสดุเศษเหลือทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน และการสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดปริมาณสาร Schizophyllan

4.1 สรุปผลการทดลอง

4.1.1 การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครงบนอาหารแข็งพีดีเอ และอาหารแข็งเอสพีบีดี ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan

การศึกษาในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อเห็ดแครงที่มีลักษณะการเจริญเติบโต มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan สูงสุด 3 ไอโซเลตที่แยกได้จากเห็ดแครงที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัด พัทลุง สงขลา และยะลา ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง แบ่งเก็บจังหวัดละ 3 ตัวอย่าง คือ เชื้อเห็ดแครงที่เก็บในจังหวัดพัทลุงได้แก่ เชื้อเห็ดแครง P1, P2 และ P3 เชื้อเห็ดแครงที่เก็บในจังหวัดสงขลา ได้แก่ เชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ S3 เชื้อเห็ดแครงที่เก็บในจังหวัดยะลา ได้แก่ เชื้อเห็ดแครง Y1,Y2 และ จากการทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดแครงทั้ง 9 ไอโซเลตที่แยกได้จากเห็ดแครง 9 ตัวอย่าง เชื้อเห็ดแครงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan สูงสุด ได้แก่เชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเออยู่ในช่วง 8.3-8.5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดีเท่ากับ 9.0 เซนติเมตร มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 5.22-6.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และมีปริมาณสาร Schizophyllan อยู่ในช่วง 3.35-4.19 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 เพื่อใช้ในการทดลองการเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

4.1.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan

การศึกษาในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครงบนวัสดุเศษเหลือทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน โดยศึกษาถึงอัตราส่วนของวัสดุเพาะที่เหมาะสม ได้แก่ อัตราส่วนของวัสดุเพาะ ความชื้นเริ่มต้น อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และภาชนะบรรจุ จากการศึกษาพบว่าเส้นใยเห็ดแครงเจริญดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในกล่อง Polyvinyl chloride (PVC) บรรจุวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วนร้อยละ 70:30 ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N เท่ากับ 19 โดยใช้รำข้าว ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะเท่ากับ 5.83 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 15 วัน มีค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา (BE) เท่ากับ 46.14 สามารถเก็บดอกเห็ดได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ดอกเห็ดที่ได้มีขนาดของดอกที่ใหญ่ มีสีขาวนวล ปราศจากการปนเปื้อนของวัสดุอื่น เมื่อนำดอกเห็ดที่ได้ไปสกัดที่อุณหภูมิ 70, 90 และ 110 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 60, 90 และ 120 นาที พบว่าสารโพลิแซคคาไรด์มีปริมาณสูงสุดเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 60 นาที เท่ากับ 12.73 และสาร Schizophyllan มีปริมาณสูงสุดเมื่อสกัดด้วยอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 120 นาที เท่ากับ 9.31 เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ และสาร Schizophyllan พบว่าสามารถช่วยลดอุณหภูมิในการสกัดลงได้

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรมีการศึกษาต่อในระดับอุตสาหกรรม และศึกษาต่อในเห็ดอื่นๆ

4.2.2 ควรมีการนำวัสดุเหลือทิ้งอื่นๆ เช่น น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม น้ำเสียจากอุตสาหกรรมผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง หรือ วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสอื่นๆ มาทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด เพื่อสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง

4.2.3 ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดการวัสดุเหลือทิ้งโดยนำกลับมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้ง โดยอาศัยเชื้อเห็ดแครง ให้อยู่ในสภาพที่ย่อยสลายง่ายเท่านั้น แต่ไม่ได้เป็นการจัดการวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวให้หมดไป ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อเกี่ยวกับการจัดการวัสดุเหลือทิ้งที่ผ่านการเพาะเห็ดแครง เช่น การผลิตปุ๋ยหมัก นำกลับมาใช้เป็นวัสดุในการเพาะเลี้ยงเห็ดฟาง

เอกสารอ้างอิง

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

กรมควบคุมมลพิษ. 2553. **มาตรฐานคุณภาพน้ำ**. http://www.pcd.go.th (สืบค้นเมื่อวันที่ 7 กันยายน 2553).

กรมพัฒนาที่ดิน. 2545. **คู่มือเจ้าหน้าที่รัฐ**. การปรับปรุงบำรุงดินด้วยอินทรียวัตถุ กลุ่มอินทรีย์ และวัสดุเหลือใช้ กองอนุรักษ์ดินและน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. **คู่มือการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัสดุปรับปรุงดินและการวิเคราะห์เพื่อตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า**. เล่มที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2553. **คู่มือการวิเคราะห์ดิน น้ำ และพืช ด้านสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักวิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนาที่ดิน.

กรมวิชาการเกษตร.2553. **เห็ดฟางกองเตี้ย เกษตรออนไลน์**. กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. http://kasetonline. com (สืบค้นเมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2555).

เกษม พลายแก้ว.2553. **เคมีทั่วไป1**. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จีร์ ศรชัย. 2553. **เพาะเห็ดฟางจากทะลายปาล์มเปล่า**. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ฉบับวันอังคารที่ 14 สิงหาคม.

ฐานิตย์ เมธิยานนท์ สราวุธ สังวรกาญจน์ ประสาน สถิตเรืองศักดิ์ และสุวิทย์ เตีย. 2553. **ผลกระทบของวิธีการจ่ายเติมแต่งในการเผาไหม้ทะลายปาล์มเปล่าในเตาเผาไหม้ตะกรับแบบขั้น ต่อความสามารถในการแลกเปลี่ยนความร้อนท่อไอน้ำอวดยิ่ง**. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการเครือข่ายการวิศวกรรมเครื่องกลแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24 พิมพ์ครั้งที่ 1. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ทศพร ทองเที่ยง วิศรุต สุขเจริญ บุษยา บุนนาค และ ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. 2549. ผลของปุ๋ยและวัสดุกลบที่เป็นแหล่งของธาตุอาหารต่อผลผลิตเห็ดนกยูง. **วารสารวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจุลจอมเกล้าธนบุรี** 29 (4):527-538.

ธีรพงค์ จันทร์นิยม. 2551. กระบวนการไร้ของเสียในอุตสาหกรรมสกัดปาล์มน้ำมัน.**วารสารหาดใหญ่วิชาการ** 6(2):159-164.

ธีระ เอกสมทราเมษ โอภาส พิมพา นิคม แหลมสัก. 2551.สารพัดประโยชน์ปาล์มน้ำมัน. **วารสารประชาคมวิจัย Food Feed Fuel** 14 (82):8-20.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **จุลชีววิทยาทั่วไป**.พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิภาพร อามัสสา นิวัติ เสนาะเมือง. 2548. ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 10(4):311-321.

ปรียาภรณ์ แนมใส. 2546. อิทธิพลของวัสดุเพาะต่อการเจริญเติบโตของพัก.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาพืชสวน มหาวิทยาลัยแม้โจ้.

ภานุพงค์ บางรักษ์. 2548. การผลิตปุ๋ยหมักจากวัสดุเศษเหลือโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มผสมน้ำหมักของ*Rhodobacter capsulatus* SS3 และ การใช้ในการปลูกผักบุ้งและต้นหอม.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มุกดา คูหิรัญ และปาริชาติ ภูสว่าง. 2545. การคัดเลือกพันธุ์เห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) พันธุ์ลูกผสมที่มีปริมาณพอลิแซกคาไรด์สูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเกษตรศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม. 2535. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principles and techniques of instrumental analysis.** กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์

ยงยุทธ โอสถสภา อรรถศิษฐ์ วงศ์มณีโรจน์ และ ชวลิต ฮงประยูร. 2551. **ปุ๋ยเพื่อการเกษตรยั่งยืน** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รานี สุวรรณพฤกษ์. 2552. **เคมีทั่วไป**.พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : วิทยพัฒน์.

รื่นฤดี โซ่มงคล ดวงทิพ มูลมั่งมี สมพร มูลมั่งมี.2549. การศึกษาวิธีการแยกบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางเภสัชของโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดกินได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วธิดา คะนะแนม. 2552. ผลของมูลไก่ กากตะกอนดีแคนเตอร์ และดินแดงในการผลิตปุ๋ยหมักจากทะลายปาล์มเปล่าน้ำมัน.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2536. **การผลิตเห็ด**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2539. **การเพาะเห็ดป่า**. วารสารสงขลานครินทร์ 18 (4):379-406.

วาริณี ธรรมชาติไพศาล. 2554. **คู่มือการเพาะเห็ด**.พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิโชติ จงรุ่งโรจน์. 2550. การศึกษาห่วงโซ่ (Value Chain) การผลิตของปาล์มน้ำมัน. **วารสารเศรษฐกิจและสังคม** 4(3):78-79.

วิทยา ทวีนุช.2552. *การเพาะเห็ดแบบเศรษฐกิจพอเพียง*.พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สกายบุค.

ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2544. **การวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริโฉม เหลืองอ่อน. 2541.โพลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์:คุณสมบัติและการใช้ประโยชน์.**วารสารวิทยาศาสตรบูรพา** 6(1):145-152.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. 2555. ธุรกิจปาล์มน้ำมันหลังหลังก้าวสู่ AEC. http://www.ksmecare.com (สืบค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2555)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. *Tistr News* .http://tistr-foodprocess.net/tistr (สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2553).

สาวิตรี จันทรานุรักษ์ และ ธราพงษ์ วิฑิตศานนท์. 2545. การพัฒนาทะลายปาล์มเป็นเชื้อเพลิงหุงต้ม.**วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 17(2):T-32.

สาวิตรี จันทรานุรักษ์ .2548. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำเนาว์ ฤทธินุช. 2554. **คู่มือพึ่งตนเอง สูตรเด็ดการเพาะเห็ดฟางในตะกร้า**. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : รุ่งเรืองสาส์นการพิมพ์**.**

สุรัตน์ อัตต. 2553. ปุ๋ยอินทรีย์จากเศษทะลายปาล์มผลิตภัณฑ์คุณภาพ.หนังสือพิมพ์คมชัดลึกฉบับวันเสาร์ที่ 6 มีนาคม.

สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ. 2553. การผลิตน้ำเห็ดสมุนไพรสกัดพร้อมดื่ม. **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ** 20(2):278-288.

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.2551.ข้อมูลการผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ: ปาล์มน้ำมัน http://www.oae.go.th/Area.htm (สืบค้นเมื่อวันที่ 20 กรกฎาคม 2555)

อธิปัตย์ คลังบุญครอง. 2550. การผลิตบีต้ากลูแคนจากยีสโดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักระบบอากาศลอยตัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล.2541.เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก.**วารสารข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด** 13(3):8-11

อนงค์ จันทร์ศรีกุล.2546. **เห็ดเมืองไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช

อภิญญา บรรลือทรัพย์. 2551. การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัมพา คำวงษา.2554. **คู่มือการเพาะเห็ดเงินล้าน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : นาคาอินเตอร์มีเดีย

Adejoy, O.D., Tayo, B.C., Ojunjobi, A.A., Afolabi, O.O. 2007. Physicochemical Studies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian Edible Fungus. **Applied Sciences** 2 : 73-76.

Akpanabiatu, M.I., Ekpa, O.D., Mauro, A., Rizzo R., 2001. Nutrient composition of Nigerian palm kernel from the dura and tenera varieties of the oil palm (Elaeis guineensis). **Food Chemistry** 72:173-177.

Alam, M.Z., Mamun, A.A., Qudsieh, I.Y., Muyibi, S.A., Salleh, H.M., Omar, N.M. 2009. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering** 46:61-64.

Chi, X.Q., Chang.K.C.,Schwarz,J.G., Weisenborn, D.P., and Shih, M.C., 1996. Optimizing pectin extraction from sunflower head by alkaline washing**. Bioresource Technology** 58(3):291-297.

Chiew, L.K and Rahman, Z.A. 2002. The effects oil palm emty fruit bunches on oil palm nutrition and yield and soil chemical property. **Oil Palm Research** 14(2):1-9.

Cho, E.J., Oh, J.Y., Chang, H.Y., Yun, J.W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelialculture of a mushroom *Tremella fuciformis.* **Biotechnology** 127:129-140.

Cruz, O.S., Castan, G.S., Hach, J., Rojas, L.M. G. and Torres E.F. 1999. Effect of substrate composition on the mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*. An analysis by mixture and response surface methodologies. **Process Biochemistry** 35: 127–133.

Demirbas, A. 2005. b-Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey. **Food Chemistry** 90:773-777.

Dubios, 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.

Guo, X., Zou, X., Sun, M. 2010. Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterizationof polysaccharides from *Phellinus igniarius*. **Carbohydrate Polymers** 80:344–349.

Haddadin, M.S., Al-Natour, R., Al-Qsous S., Robinson, R.K. (2002). Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. **Bioresource** 82(2): 131-137.

Henriksson,G., Johansson, G., Pettersson, G. 2000.A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Biotechnology** 78:93–113.

Homma, H., Shinoyama, H., Nobuta Y., Terashima, Y., Amachi S., Fujii T. 1997. Lignin-degrading activity of edible mushroom Strobilurus ohshimae thatforms fruiting bodies on buried sugi (Cryptomeria japonica) twigs . **Wood Research** 53:80-84.

Huang,H.C., Liu, Y.S .2008. Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of Grifola umbellata. **Chemical Engineers** 39 :307–311.

Jie, X., Cao, Y., Qin, J.J., Liu, J., Yuan, Q. 2005. Influence of drying method on morphology and propertiesof asymmetric cellulose hollow fiber membrane. **Membrane Science** 246:157–165.

Karinaga, R., Anada, T., Minari, J., Mizu, M., Koumoto, K., Fukud, J., Nakazawa, K., Hasegawa, T., Numata,M., Shinkai, S., Sakurai, K. 2006. Galactose-PEG dual conjugation of b-(1-3)-D-glucan schizophyllanfor antisense oligonucleotides delivery to enhance the cellular uptake. **Biomaterials** 27:1626-1635.

Karoline, C. Manthey., Rocio, R.M., Jia,T.H., Janos ,Z. 2006. Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2triggering arrest in G1 phase of the cell cycle. **Nutritional Biochemistry** 17:250- 256.

Kim, K.S. and S. Hyun Y. 2006. Production of soluble beta-glucan from the cell wallof *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology** 39: 496–500.

Kim, S., Kim, W., and Huang, I.K. 2003. Optimazation extraction and purification oligosaccharide from defatted soybean meal**. Food Science Technology** 38(1):337-342**.**

Kitamura, S., Hirono, T., Takea, K., Fukada, H., Takahashi, K., Falch, B., and Stokke, B. 1996. Conformation transition of Schizophyllan in aqueous alkaline solution. **Biopolymer** 39:407-416.

Klaus ,A., Kozarski, M., Niksic M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Leo, J.L.D. Griensven, Van. 2011.Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharidesextracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune.* **Food Science and Technology** 3:1-7.

Kumari, M.A., Shrikant A. Survase. 2008. Production of Schizophyllan using *Schizophyllum commune*. **Bioresource Technology** 99:1036–1043.

Lau, K. L., Y. Y. Tsang and S. W. Chiu. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Chemosphere** 52: 1539-1546.

Lee, S.A., Bae, H., Kim, N., Hwang. S. 2008. Optimization of Growth Conditions of *Lentinus edodes* Myceliumon Corn Processing Waste Using Response Surface Analysis. **Bio science and Bioengineering** 2: 161–163.

Loss, E., Royer, A.R. Barreto-Rodrigues,M.,and Barana,A.C.2009.Use of maize wastewater for the Cultivation of the *Pleurotus* spp. Mushroom and optimization of its biological efficiency. **Hazadous Material** 166:1522-1525.

Luis, F., Gutiérrez, Óscar, J., Sánchez, Carlos A. C. 2009. **Bioresource Technology** 100 :1227–1237.

Mandeel, G.A. 2005.Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus spp.)* 0n Various lignocellulosic WasteWorld. **Microbiology and Biotechnology** 21:601-607.

Manzi, P.,Aguzzi. A.,Pizzoperrato.L.2001. Nutrition Value of mushroom widely comsum in Italy. **Food chemistry** 73:321-325.

Mao, X.B., Eksriwongb, T., Chauvatcharinb S., Jiang Z. J. 2005 Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation ofmedicinal mushroom Cordyceps militaris. **Process Biochemistry** 40:1667–1672.

Matsumoto, T., Numata, M., Anada, T., Mizu, M., Koumoto K., Kazuo, S., Nagasaki, T. 2004. Chemically modified polysaccharide schizophyllan for antisenseoligonucleotides delivery to enhance the cellular uptake efficiency. Biochimica et Biophysica 1670: 91-104

Menon ,V., and M. Roa. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science** 38:522-550

Novozamsky, R., Eck, J. V., Shcouwenburg, C. h., Wallinga. V. I. 1974. Total nitrogendetermination in plant material by means of the indophenol blue method. **Agric Sci** 22:3-5.

Perez, J., Munoz. J. D., Dela rubia, T., Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloseand lignin: an overview. **Int Microbiol** 5: 53-63.

Philippoussis, A., Zervkis, G., and P. Diamantopoulou. 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Vollvarella volvacea* and *Pleurotus* spp. **Microbiology and Biotechnology** 17: 191-200.

Philippoussisa, A., Panagiota D., Israilides, C. 2007. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of themedicinal fungus *Lentinula edodes*. **International Biodeterioration & Biodegradation** 59:216–219.

Rabinovich, M.L. 2004. Fungal decomposition of natural aroma structures and xenobiotics : a review**. Appl Biochem Microbiol** 40:1–17.

Rhee, S.J., Cho S.Y., Kim, K.M., Cha, D.Su., Park, H.Jin. 2008. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble b-glucan in medicinal mushroom, Chaga (Inonotus obliquus). **Research Note** 4:545-549.

Robert, G. W., and Bruce, A. M. 1972. Decomposition of Dissolved Organic Carbon and Nitrogen Compounds from Leaves in an Experimental Hard-Water Stream. **Limnology and Oceanography** 17:229-279.

Saletes, S., Caliman, J. P. and Raham, D. 2004. Study of mineral nutrient losses from oil palm emty fruit banches during temporary storage. **Applied Science in Environment Sanitation** 2(2):57-62

Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic residues:Biodegradation and bioconversion by fungi. **Sciences.Biotechnology** 27:185–194.

Shen , Q., Liu, P., Wang, X., Daniel J., Royse, b .2008. Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosityon shiitake (*Lentinula edodes*) yield. **Bioresource Technology** 99 :8212–8216.

Shi,X., Chang.K.C., Shawrz. J.G., Weisonborn.D.P and Shih .M.C.1996. Optimazation pectin extraction from sunflower head by alkaline washing. **Bioresouce Technology** 58(3) 291-297.

Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Speed Press. Berkeley, California. USA. stimulators: a review of their anti-infective potential. **Immunother** 5: 392-399.

Steamy, k. 2009. Japanese Mushroom Recipes. http://steamykitchen.com. (accessed August 7, 2012).

Sumathai, S.A. 2008. Utilization of oil palm as asource of renewableenergy in Malaysia. Renewable and Sustainable. **Energy Reviews** 12: 2404–2421.

Suwanno,S., Nakamura, K., Amano,Y., Shida, M and Horiuchi. 2005. Deverlopment of the method for efficient disruption and rapid extraction on theß-l-3 glucan determination from the mycelium of *Ganoderma lucidum*. **Mushroom Science and Biotechnology** 13: 83-93.

Suwanno, S. 2007. *Effect of light on mycelium growth of Ganoderma lucidum Karst*. Doctoral Dissertation.Interdisciplinary Graduat School of Medicine and Engineering. University of Yamanashi japan.

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

Walkley,A. and Blank,I.A.,1993. An examination of Degtiareff method for determinig soil organic matter,and apropose modification of the chromic acid titration method. **Soil Science** 37:29-38.

Wengel. M., Kothe. E., Christian, M. Schmidt., Heide, K., Gleixner ,G.2006.Degradation of organic matter from black shales and charcoal by thewood-rotting fungus *Schizophyllum commune* and release of DOC and heavy metals in the aqueous phase. **Science of the Total Environment** 367 :383–393

Wesenberg, D., I. Kyriakides and S. N. Agathos. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol Advances** 22: 161-187.

Wu, J. z., Cheung, P. C. K., and N. l. Huang. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus* tuber-regium (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culturemedium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry** 84: 101-105.

XuJie, H. and Wei, C. 2008. Optimization of extraction process of crude polysaccharides fromwild edible BaChu mushroom by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers** 72:67–74.

Zen,C. 2012. Mushroom Boxes. http://mushroombox.co.uk. (accessed August 7, 2012).

Zen, Z., Mccarthy, J. and Barlow, C. 2005. Environmental issues in an age of regional autonomy: the case of pollution sector of north Sumatra. **Oil palm Industry Economic** 5(2):23-36.

Zhang, M., Cui,S.W., Cheung, P.C.K. and Wang,Q. 2007 Antitumorpolysaccharides from mushrooms: a revie their isolationprocess, structuralcharacteristics andantitumor activity. **Trends in Food Science & Technologywon** 18: 4-19.

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

ก.1 สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar(PDA)

Potato infution	4.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Bacteriological agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sweet Potato Peptone Vitamin B_6 $CaCl_2$ Dextrose Agar(SPBD)

Sweet Potato (มันเทศ)	250.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	1.0	กรัมต่อลิตร
Vitamin B_6	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	1.3	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

ต้ม Sweet Potato (มันเทศ) 250 กรัม ในน้ำกลั่นจนเปื่อย กรองเอาเฉพาะน้ำ เติม Dextrose 20 กรัม Agar 20 กรัม Peptone 1 กรัม Vitamin B_6 0.5 กรัม และ$CaCl_2$ 1.3 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 นาที จากนั้นเทลงใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sweet Potato Peptone Vitamin B_6 $CaCl_2$ Dextrose Broth (SPBD Broth)

Sweet Potato (มันเทศ)	250.0	กรัมต่อลิตร
Peptone	1.0	กรัมต่อลิตร
Vitamin B_6	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCl_2$	1.3	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร

ต้ม Sweet Potato (มันเทศ) 250 กรัม ในน้ำกลั่นจนเปื่อย กรองเอาเฉพาะน้ำ เติม Dextrose 20 กรัม Peptone 1 กรัม Vitamin B_6 0.5 กรัม และ$CaCl_2$1.3 กรัม ปรับปริมาตรด้วย

น้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุลงในฟลาส์ก ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันไอน้ำ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส

ก.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์ Phenol Sulfuric colorimetric (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. กรด Sulfuric (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 95

2. Phenol (ร้อยละ5) เตรียมโดยละลาย Phenol 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. Glucose เตรียมโดยละลาย Glucose 0.02 กรัมในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ ก.1

ตารางภาคผนวกที่ ก.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Glucose ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ปริมาตรสารละลาย Glucose เข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5.0
40	0.2	4.8
80	0.4	4.6
120	0.6	4.4
160	0.8	4.2
200	1.0	4.0

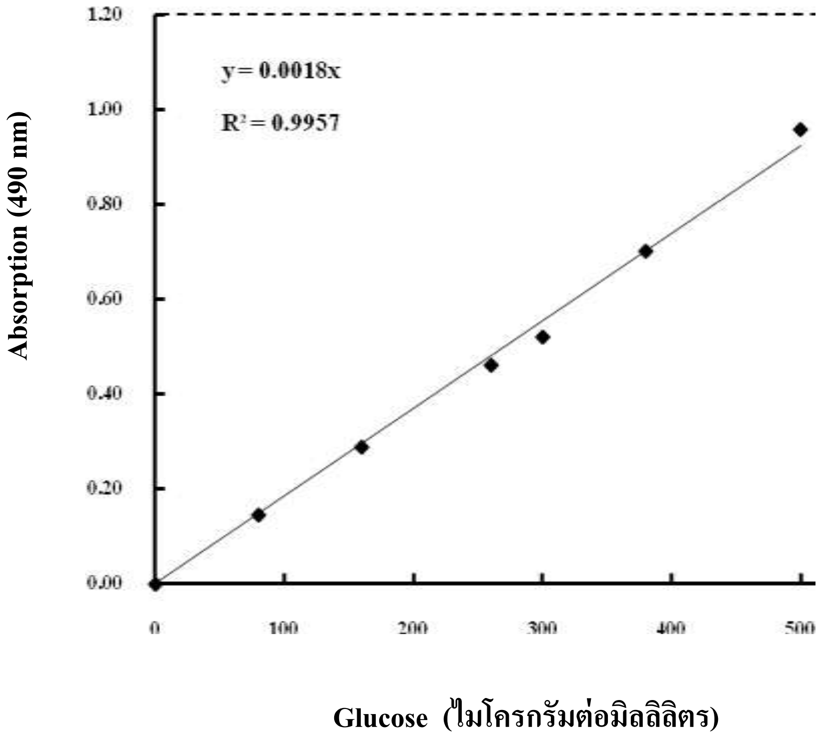
วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน Glucose (ความเข้มข้น 40-260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร ลงในขวดสีชา (Vial)

2. เติมสารละลาย Phenol (ร้อยละ 5) ลงไป 100 ไมโครลิตร

3. เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นร้อยละ 95 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที

4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ A_{490} ด้วยเครื่อง Spectro photometer (Shimazu รุ่น UV 1604)



รูปภาคผนวกที่ ก.1 กราฟมาตรฐาน Glucose วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol Sulfuric colorimetric

ก.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Schizophyllan วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue

สารเคมี

1. Total Fluorescence

1.1. Aaniline blue (ร้อยละ 0.1) เตรียมโดยละลาย Aniline blue 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.2. กรด Hydrochloric (HCl) 1 โมลาร์ เตรียมโดยตวง HCl (เข้มข้น 37%) 82.92 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.3. NaOH Glycin buffer เตรียมโดยละลาย Glycin 150.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 9.5 ด้วย NaOH 2 โมลาร์ จากนั้นผสมสารเคมีที่เตรียมไว้ในอัตราส่วนดังแสดงไว้ในตารางที่ ก.2 และ ก 3

ตารางภาคผนวกที่ ก.2 อัตราส่วนการผสมของสาร Total Fluorescence

Aniline blue (ร้อยละ 0.1)	HCl (1 โมลาร์)	NaOH Glycine buffer (2 โมลาร์)
40 มิลลิลิตร	21 มิลลิลิตร	59 มิลลิลิตร
ปริมาตรทั้งหมด 120 มิลลิลิตร		

2. Auto Fluorescence

ในการเตรียมสาร Auto Fluorescence จะมีขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับการเตรียมสาร Total Fluorescence โดยเปลี่ยนจาก Aniline blue (ร้อยละ 0.1) 40 มิลลิลิตร เป็นน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ดังตารางที่ ก.3

ตารางภาคผนวกที่ ก.3 อัตราส่วนการผสมของสาร Auto Fluorescence

น้ำกลั่น	HCl (1 โมลาร์)	NaOH Glycine buffer (2 โมลาร์)
40 มิลลิลิตร	20 มิลลิลิตร	59 มิลลิลิตร
ปริมาตรทั้งหมด 120 มิลลิลิตร		

วิธีการ

1. เตรียม Stock solution ของ β-1,3-D-glucan ยี่ห้อ Fluka โดยละลาย 0.02 กรัม ของ β-1,3-D-glucan ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นระดับต่างๆ (0-1,000ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังตารางที่ ก.4

ตารางภาคผนวกที่ ก.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน β-1,3-D-glucan ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	**ปริมาตร Stock solution เข้มข้น 1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)**	**ปริมาตร NaOH (โมลาร์) (มิลลิลิตร)**
0	0	5
100	0.5	4.5
200	1.0	4.0
400	2.0	3.0
800	4.0	1.0

2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นจาก Stock solution 400 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองโดยแยกเป็น 2 หลอด คือ Total Fluorescence และ Auto Fluorescence

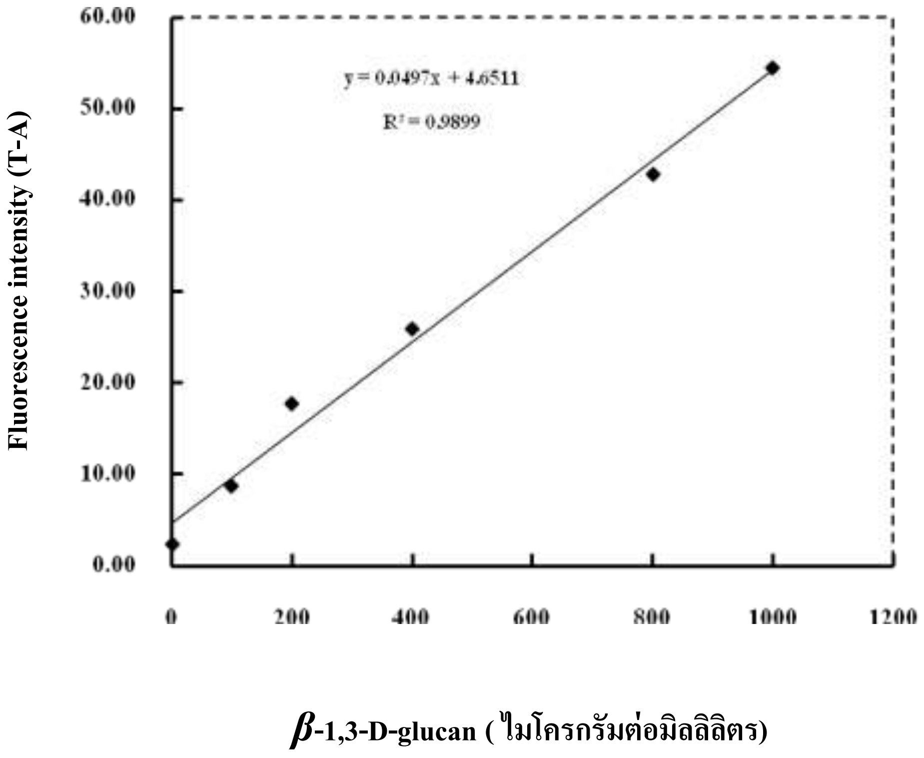
3. เติม NaOH (1โมลาร์) 800 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด เขย่าให้เข้ากัน

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

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

6. นำไปวัดค่า Fluorescence intensity ด้วยเครื่อง Fluorescence spectrophotometer (JASCO รุ่น FP-750) ความยาวคลื่น Excitation 393 นาโนเมตร Emission 479 นาโนเมตร

Fluorescence intensity = Total Fluorescence - Auto Fluorescence



รูปภาคผนวกที่ ก.2 กราฟมาตรฐาน β-1,3-D-glucan วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue

ก.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ Schizophyllan วิเคราะห์ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography **(HPLC)**

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ	: HPLC, 1100, Hewlett Packard, Germany
Column	: Lichrospher 100 RP-18 4.0×250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร
Flow rate	: 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที
Mobile phase	: น้ำ (ร้อยละ100)
Detector	: Refractive Index Detector (RID)

วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่างสารสกัดเห็ดแครง (วิธีการสกัดดังที่กล่าวไว้ในบทที่ 2)

2. เตรียมสารมาตรฐาน β-1,3-D-glucan ความเข้มข้น 0-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ฉีดสารมาตรฐาน β-1,3-D-glucan และตัวอย่างสารสกัดเห็ดแครง 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC บันทึกพื้นที่กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสาร Schizophyllan

ภาคผนวก ข
วิธีการคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน

ข.1 การคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Tchobanoglous et al., 1993)

วิธีการคำนวณอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนกรณีที่ทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน (คาร์บอน) คงที่ 1 กิโลกรัม ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (สมมุติให้อัตราส่วน C/N เริ่มต้น= 19/1) ถ้าใช้ทะลายปาล์มเปล่า+ทางใบปาล์มน้ำมัน 1 กิโลกรัม จะต้องใช้ยูเรีย X กิโลกรัม โดยมี คาร์บอน และไนโตรเจน ดังที่แสดงในตารางที่ ข.1

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด

วัสดุเพาะเห็ด	คาร์บอน (C)	ไนโตรเจน (N)
ทะลายปาล์ม+ทางใบปาล์มน้ำมัน(70:30)	21.86	0.94
ยูเรีย	12	46.60
แอมโมเนียมคลอไรด์	0	26
รำข้าว	28.92	2.10

ดังนั้น

$$\frac{\text{C รำข้าว} + \text{C ทะลาย+ทางใบ}}{\text{N รำข้าว} + \text{N ทะลาย+ทางใบ}} = \frac{19}{1}$$

$$\frac{12(X)+21.86}{46.6(X)+0.94} = \frac{19}{1}$$

$$19\,(46.6\,X+0.94) = 12(X) + 21.86$$

$$885.4X+17.86 = 12(X) + 21.86$$

$$(885.4X-12X)+17.86 = 21.86$$

$$873.4\,X + (17.86-21.86) = 0$$

$$873.4\,X + (-4) = 0$$

$$873.4\,X = 0+4$$

$$X = 4/873.4$$

$$X = 0.0046$$

ดังนั้นเมื่อต้องการอัตราส่วน C/N เริ่มต้นเท่ากับ 19/1 จะต้องใช้ทะลายปาล์มเปล่า 1 กิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) ผสมกับยูเรีย 0.0046 กิโลกรัม ดังตารางที่ ข.1.2

ภาคผนวก ค

การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ และ เอสพีบีดี

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดแครง ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 20 วัน

วันที่	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)								
	P1	**P2**	**P3**	**S1**	**S2**	**S3**	**Y1**	**Y2**	**Y3**
0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0
2	1.5+0.1	1.5+0.2	1.6+0.1	1.4+0.1	1.7+0.1	1.2+0.1	1.1+0.0	1.3+0.2	1.7+0.1
4	3.3+0.3	3.7+0.1	3.6+0.1	3.2+0.1	3.2+0.1	2.5+0.0	2.8+0.1	3.0+0.1	3.4+0.2
6	4.2 +0.3	4.7+0.3	4.2+0.3	4.7+0.1	5.3+0.1	4.0+0.0	3.8+0.1	4.4+0.1	5.0+0.2
8	5.7 +0.3	6.2+0.4	6.2+0.0	6.4+0.4	6.7+0.1	6.3+0.3	5.9+0.1	6.3+0.3	6.3+0.3
10	7.3 +0.3	7.0+0.0	7.3+0.1	7.6+0.2	7.8+0.2	6.7+0.4	7.6+0.2	7.7+0.2	7.1+0.4
12	7.7 +0.3	7.0+0.0	7.3+0.1	8.0+0.0	8.3+0.3	7.9+0.2	7.7+0.3	8.0+0.2	7.8+0.2
14	7.9 +0.2	7.0+0.0	7.3+0.1	8.4+0.1	8.5+0.2	7.9+0.2	7.7+0.3	8.0+0.2	7.8+0.2
16	7.9 +0.2	7.0+0.0	7.3+0.1	8.4+0.1	8.5+0.2	7.9+0.2	7.7+0.3	8.0+0.2	7.8+0.2
18	7.9 +0.2	7.0+0.0	7.3+0.1	8.4+0.1	8.5+0.2	7.9+0.2	7.7+0.3	8.0+0.2	7.8+0.2
20	7.9 +0.2	7.0+0.0	7.3+0.1	8.4+0.1	8.5+0.2	7.9+0.2	7.7+0.3	8.0+0.2	7.8+0.2

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

วันที่	**เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)**								
	P1	**P2**	**P3**	**S1**	**S2**	**S3**	**Y1**	**Y2**	**Y3**
0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0	0.4+0.0
2	3.2+0.1	3.8+0.2	3.6+0.2	3.8+0.1	4.1+0.1	3.6+0.1	3.4+0.5	3.2+0.1	3.5+0.2
4	6.2+0.2	6.6+0.5	6.5+0.2	6.7+0.2	7.3+0.2	6.1+0.4	5.5+0.2	5.4+0.2	6.0+0.1
6	7.5+0.1	7.8+0.3	7.9+0.4	8.8+0.3	8.8+0.1	8.6+0.5	7.4+0.3	8.4+0.1	8.5+0.1
8	8.5+0.2	8.5+0.3	8.5+0.2	9.0+0.0	9.0+0.0	8.9+0.2	8.5+0.3	9.0+0.0	9.0+0.0
10	8.6+0.1	8.7+0.2	8.7+0.2	9.0+0.0	9.0+0.0	8.9+0.2	8.8+0.2	9.0+0.0	9.0+0.0
12	8.6+0.1	8.7+0.2	8.7+0.2	9.0+0.0	9.0+0.0	8.9+0.2	8.8+0.2	9.0+0.0	9.0+0.0

ภาคผนวก ง

การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

ผลของอัตราส่วนวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน)

ตารางภาคผนวกที่ ง.1. การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครง S1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
0	0.062±0.05	0.062±0.05	0.062±0.05	0.062±0.05	0.062±0.05
3	0.206±0.11	0.212±0.09	0.238±0.15	0.304±0.17	0.234±0.07
6	0.326±0.06	0.388±0.07	0.440±0.10	0.632±0.05	0.460±0.16
9	0.526±0.09	0.562±0.13	0.618±0.21	0.850±0.04	0.600±0.08
12	0.654±0.07	0.662±0.17	0.748±0.10	0.996±0.11	0.714±0.14
15	0.756±0.12	0.762±0.10	0.844±0.09	1.118±0.07	0.886±0.08
18	0.790±0.12	0.792±0.06	0.918±0.05	1.216±0.06	0.988±0.08
21	0.800±0.09	0.800±0.10	0.942±0.08	1.280±0.08	1.062±0.13
24	0.814±0.07	0.818±0.07	0.980±0.08	1.312±0.10	1.096±0.05
27	0.824±0.14	0.840±0.07	1.000±0.08	1.340±0.05	1.126±0.11

ตารางภาคผนวกที่ ง.2 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
0	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08
3	0.306±0.14	0.226±0.13	0.278±0.05	0.352±0.05	0.242±0.20
6	0.372±0.07	0.416±0.19	0.520±0.11	0.678±0.13	0.486±0.05
9	0.526±0.10	0.674±0.07	0.656±0.09	0.894±0.04	0.638±0.11
12	0.690±0.10	0.758±0.07	0.770±0.13	1.012±0.06	0.780±0.23
15	0.764±0.15	0.852±0.16	0.882±0.18	1.158±0.07	0.926±0.09
18	0.800±0.07	0.898±0.07	0.916±0.04	1.274±0.08	1.032±0.09
21	0.828±0.08	0.912±0.12	0.966±0.10	1.362±0.07	1.112±0.07
24	0.858±0.05	0.926±0.15	1.006±0.15	1.432±0.10	1.122±0.13
27	0.870±0.05	0.980±0.04	1.014±0.09	1.440±0.09	1.130±0.04

ตารางภาคผนวกที่ ง.3 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง Y3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันที่อัตราส่วนต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในถุงพลาสติก

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
0	0.052±0.11	0.052±0.11	0.052±0.11	0.052±0.11	0.052±0.11
3	0.226±0.16	0.158±0.16	0.214±0.16	0.276±0.15	0.240±0.11
6	0.330±0.06	0.368±0.16	0.428 ±0.06	0.564±0.05	0.468±0.26
9	0.444±0.15	0.514±0.12	0.594±0.14	0.702±0.06	0.578±0.10
12	0.528±0.09	0.642±0.21	0.684±0.11	0.810±0.14	0.680±0.07
15	0.628±0.12	0.712±0.05	0.766±0.05	0.916±0.06	0.790±0.07
18	0.680±0.05	0.752±0.06	0.814±0.09	1.034±0.09	0.888±0.17
21	0.732±0.04	0.796±0.10	0.838±0.14	1.116±0.06	0.954±0.10
24	0.768±0.04	0.830±0.04	0.876±0.15	1.176±0.07	0.998±0.05
27	0.820±0.02	0.854±0.04	0.914±0.09	1.194±0.05	1.018±0.04

ตารางภาคผนวกที่ ง.4 ความยาวของเส้นใยเห็ด S1 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
2	0.9±0.06	0.8±0.05	1.1±0.20	1.3±0.09	1.2±0.10
4	1.7±0.12	1.9±0.16	2.1±0.10	2.3±0.17	2.1±0.15
6	3.3±0.30	3.8±0.30	3.9±0.16	4.0±0.30	3.9±0.10
8	5.3±0.20	5.5±0.17	5.8±0.15	6.2±0.30	6.0±0.15
10	6.7±0.10	7.0±0.00	7.1±0.10	7.4±0.20	7.3±0.10
12	6.7±0.10	7.0±0.00	7.1±0.10	7.4±0.20	7.3±0.10
14	6.7±0.10	7.0±0.00	7.1±0.10	7.4±0.20	7.3±0.10

ตารางภาคผนวกที่ ง.5 ความยาวของเส้นใยเห็ด S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
2	1.0±0.06	1.0±0.09	1.3±0.12	1.5±0.15	1.5±0.09
4	1.8±0.10	2.0±0.10	2.1±0.20	2.5±0.10	2.3±0.10
6	3.6±0.21	4.1±0.12	4.1±0.06	4.3±0.10	4.2±0.12
8	5.3±0.35	5.9±0.17	6.4±0.15	7.0±0.15	6.6±0.10
10	6.9±0.05	7.1±0.08	7.2±0.08	7.5±0.06	7.3±0.00
12	6.9±0.05	7.1±0.08	7.3±0.06	7.5±0.06	7.3±0.00
14	6.9±0.05	7.1±0.08	7.3±0.06	7.5±0.06	7.3±0.00

ตารางภาคผนวกที่ ง.6 ความยาวของเส้นใยเห็ด Y3 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 ในหลอดทดลอง

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	100:0	**90:10**	**80:20**	**70:30**	**60:40**
2	0.7±0.05	0.8±0.10	0.9±0.20	1.1 ±0.16	1.2±0.10
4	1.7±0.20	1.9±0.16	1.9±0.20	2.3±0.07	2.1±0.15
6	3.0±0.25	3.5±0.10	3.7±0.30	4.2±0.06	3.9±0.10
8	4.9±0.20	5.3±0.30	5.7±0.15	6.2±0.10	6.0±0.15
10	6.5±0.10	6.9±0.10	7.1±0.20	7.4±0.20	7.3±0.10
12	6.5±0.10	6.9±0.10	7.1±0.20	7.4±0.20	7.3±0.10
14	6.5±0.10	6.9±0.10	7.1±0.20	7.4±0.20	7.3±0.10

ผลของความชื้นในวัตถุดิบเริ่มต้นต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

ตารางภาคผนวกที่ ง.7 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ที่ระดับความชื้นต่างๆ

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**			
	Control (80)	**70**	**60**	**50**
0	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08
3	0.320±0.09	0.762±0.12	0.978±0.26	0.406±0.21
6	0.668±0.13	1.376±0.12	1.782±0.10	0.682±0.09
9	0.848±0.06	1.966±0.13	2.404±0.11	0.906±0.16
12	0.994±0.10	2.514±0.22	2.902±0.18	0.978±0.25
15	1.146±0.23	2.962±0.15	3.390±0.25	1.028±0.07
18	1.244±0.19	3.290±0.19	3.932±0.11	1.172±0.08
21	1.354±0.04	3.582±0.25	4.290±0.11	1.216±0.13
24	1.424±0.13	3.622±0.18	4.438±0.12	1.244±0.19
27	1.432±0.08	3.644±0.09	4.450±0.12	1.278±0.19

ผลของอัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจนต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

ตารางภาคผนวกที่ ง.8 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยยูเรีย

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	Control (23.26)	**17**	**19**	**21**	**23**
0	0.084±0.13	0.084±0.08	0.084±0.13	0.084±0.13	0.084±0.13
3	0.964±0.15	0.986±0.08	1.130±0.09	1.008±0.35	0.980±0.21
6	1.782±0.10	1.798±0.07	1.946±0.07	1.874±0.28	1.784±0.41
9	2.226±0.30	2.446±0. 12	2.758±0.22	2.562±0.24	2.442±0.24
12	2.768±0.30	2.780±0.17	3.318±0.34	3.150±0.07	2.786±0.21
15	3.122±0.16	3.460±0.23	3.828±0.26	3.734±0.32	3.446±0.19
18	3.752±0.11	4.174±0.12	4.566±0.40	4.194±0.16	4.172±0.43
21	4.030±0.17	4.402±0.16	4.902±0.34	4.632±0.27	4.396±0.37
24	4.064±0.15	4.488±0.19	5.086±0.23	4.764±0.11	4.484±0.07

ตารางภาคผนวกที่ ง.9 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วย NH_4Cl

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	Control (23.26)	**17**	**19**	**21**	**23**
0	0.084±0.08	0.084±0.08	0.08±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08
3	0.964±0.15	1.044±0.13	1.074±0.17	1.148±0.35	1.040±0.54
6	1.782±0.10	1.808±0.12	1.988±0.16	2.012±0.28	1.970±0.22
9	2.226±0.30	2.446±0.23	2.666±0.33	2.778±0.24	2.582±0.47
12	2.768±0.30	3.022±0.35	3.194±0.50	3.372±0.07	3.034±0.18
15	3.122±0.16	3.618±0.21	3.816±0.09	3.996±0.32	3.782±0.46
18	3.752±0.11	4.124±0.15	4.420±0.35	4.730±0.16	4.306±0.19
21	4.030±0.17	4.400±0.33	4.712±0.33	5.236±0.27	4.442±0.33
24	4.064±0.15	4.574±0.25	4.864±0.15	5.312±0.11	4.780±0.56

ตารางภาคผนวกที่ ง.10 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ที่ระดับต่างๆ ด้วยรำข้าว

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**				
	Control (23.26)	**17**	**19**	**21**	**23**
0	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08	0.084±0.08
3	0.962±0.24	0.972±0.21	1.214±0.05	1.030±0.11	0.984±0.16
6	1.742±0.11	1.856±0.17	2.064±0.38	1.922±0.14	1.864±0.08
9	2.408±0. 12	2.440±0.14	2.822±0.18	2.742±0.24	2.442±0.08
12	2.786±0.17	2.908±0.04	3.936±0.11	3.378±0.24	3.108±0.08
15	3.384±0.23	3.522±0.10	4.454±0.19	4.088±0.10	3.418±0.08
18	3.920±0.12	3.944±0.15	4.932±0.19	4.374±0.17	3.832±0.08
21	4.082±0.16	4.422±0.13	6.028±0.20	5.144±0.17	4.442±0.08
24	4.424±0.19	5.098±0.19	6.468±0.03	6.142±0.06	5.180±0.08

ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

ตารางภาคผนวกที่ ง.11 น้ำหนักแห้งที่หายไปของเส้นใยเห็ดแครง S2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเริ่มต้นระดับต่างๆ

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**		
	Control (5%)	**10%**	**15%**
0	0.084±0.08	0.372±0.19	0.178±0.15
3	1.234±0.11	1.316±0.11	1.652±0.17
6	2.024±0.37	2.714±0.22	2.866±0.29
9	2.802±0.12	4.228±0.18	3.736±0.40
12	3.970±0.16	4.894±0.41	4.710±0.39
15	4.450±0.22	5.770±0.14	5.320±0.33

ผลของภาชนะบรรจุต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

ตารางภาคผนวกที่ ง. 12 น้ำหนักแห้งที่หายไปของวัสดุเพาะ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดแครง S2 บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่า และทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 ปรับอัตราส่วน C/N ด้วยรำข้าว (C/N=19) ปริมาณเชื้อ เริ่มต้นร้อยละ 10 ในกล่อง (PVC) และถุงพลาสติก (PVC)

วันที่	**น้ำหนักเซลล์แห้งที่หายไป (กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ)**	
	ถุงพลาสติก (PP)	**กล่อง (PVC)**
0	0.089±0.08	0.089±0.08
3	1.842±0.15	2.425±0.19
6	2.895±0.30	3.625±0.25
9	3.979±0.35	4.534±0.16
12	5.042±0.39	5.369±0.31
15	5.500±0.57	5.830±0.23

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์

ตารางภาคผนวกที่ ง. 13 ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 12 วัน ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric

เชื้อเห็ดแครง	**โพลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**
P1	4.78±0.30
P2	3.34±0.21
P3	5.24±0.51
S1	5.87±0.23
S2	6.04±0.36
S3	3.60±0.31
Y1	3.30±0.23
Y2	4.73±0.76
Y3	5.22 ±0.47

ตารางภาคผนวกที่ ง.14 ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol sulfuric colorimetric

อุณหภูมิ/เวลา องศาเซลเซียส/นาที	โพลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
70/60	10.42±0.2
70/90	10.72±0.5
70/120	11.08±0.4
90/60	11.32±0.5
90/90	11.73±0.4
90/120	11.79±0.7
110/60	12.73±0.2
110/90	12.81±0.5
110/120	12.93±0.3
120/120 (control)	11.83±0.4

ตารางภาคผนวกที่ ง.15 ปริมาณสาร Schizophyllan ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่ บนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน ด้วยวิธี Aniline blue

เชื้อเห็ดแครง	Schizophyllan (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
P1	1.45 ± 0.20
P2	1.38 ± 0.06
P3	1.32 ± 0.10
S1	1.92 ± 0.05
S2	1.98 ± 0.06
S3	1.02 ± 0.03
Y1	1.34 ± 0.05
Y2	1.04 ± 0.08
Y3	1.83 ± 0.17

ตารางภาคผนวกที่ ง.16 ปริมาณสาร Schizophyllan ของเส้นใยเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน ด้วยวิธี HPL

เชื้อเห็ดแครง	**Schizophyllan (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**
P1	3.13 ± 0.18
P2	2.99 ± 0.03
P3	2.39 ± 0.05
S1	3.92 ± 0.03
S2	4.20 ± 0.07
S3	2.44 ± 0.03
Y1	2.63 ± 0.01
Y2	2.45 ± 0.10
Y3	3.36 ± 0.14

ตารางภาคผนวกที่ ง.17 ปริมาณสาร Schizophyllan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี Aniline blue

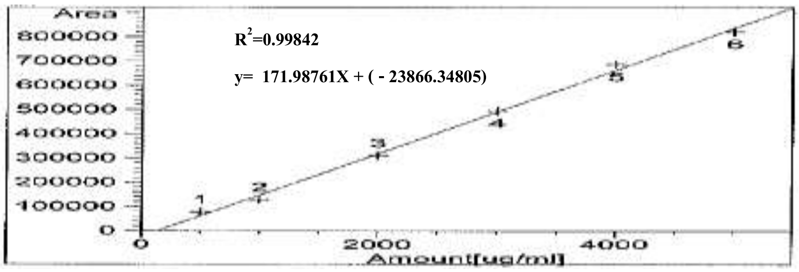
อุณหภูมิ/เวลา องศาเซลเซียส/นาที	**Schizophyllan (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)**
70/60	2.42 ± 0.21
70/90	2.74 ± 0.13
70/120	2.86 ± 0.15
90/60	3.13 ± 0.18
90/90	3.36 ± 0.08
90/120	3.39 ± 0.15
110/60	3.87 ± 0.07
110/90	4.09 ± 0.20
110/120	4.38 ± 0.08
120/120 (control)	3.88 ± 0.11

ตารางภาคผนวกที่ ง.18 ปริมาณสาร Schizophyllan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆกัน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

อุณหภูมิ/เวลา องศาเซลเซียส/นาที	โพลิแซคคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
70/60	5.12 ± 0.18
70/90	5.35 ± 0.04
70/110	5.54 ± 0.01
90/60	6.30 ± 0.03
90/90	6.46 ± 0.04
90/110	6.78 ± 0.15
110/60	7.19 ± 0.07
110/90	8.71 ± 0.20
110/110	9.31 ± 0.08
120/120 (control)	8.90 ± 0.11

ภาคผนวก จ

ลักษณะกราฟมาตรฐาน และโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography **(HPLC)**



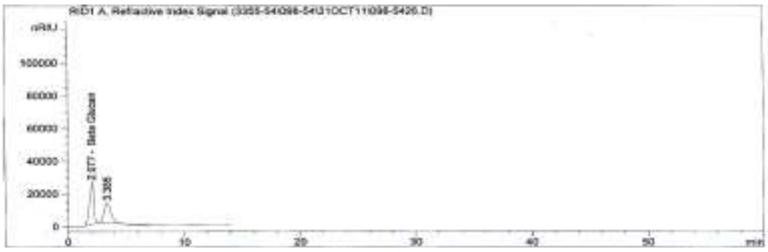
รูปภาคผนวกที่ จ.1 ลักษณะกราฟมาตรฐานของสาร β-glucan

รูปภาคผนวกที่ จ.2 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน β-glucan

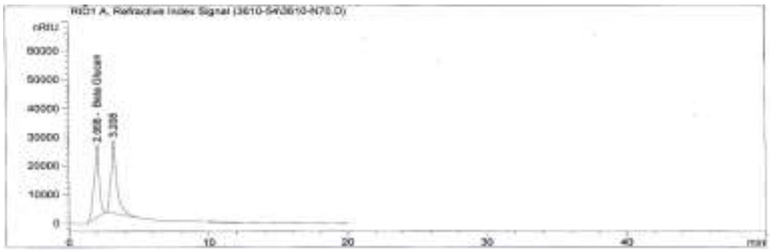
รูปภาคผนวกที่ จ.3 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง P1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดีในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

รูภาคผนวกปที่ จ.4 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง P2 ที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

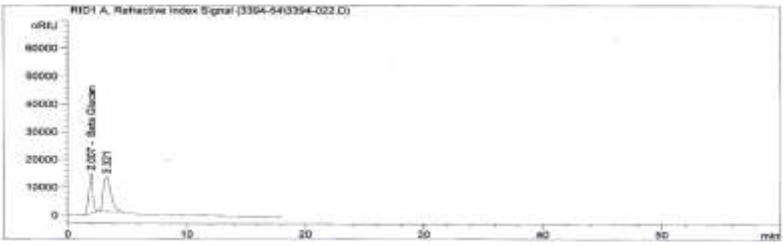
รูปภาคผนวกที่ จ.5 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง P3 ที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน



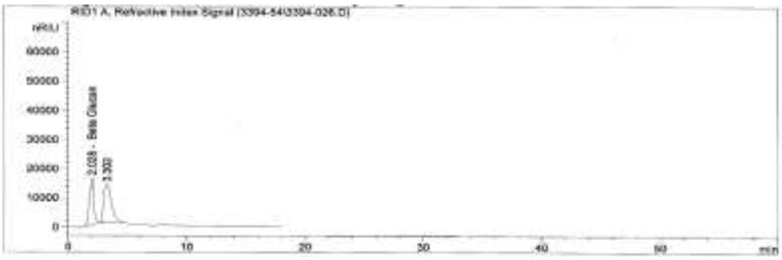
รูปที่ภาคผนวกที่ จ.6 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง S1 ที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน



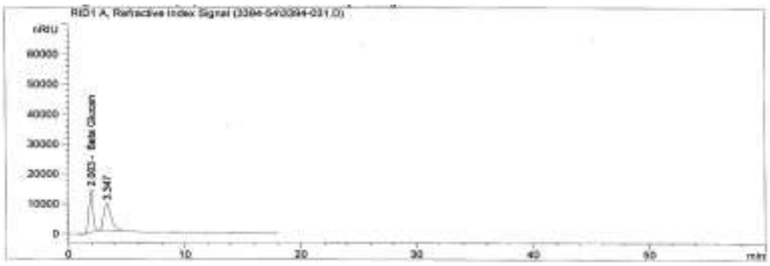
รูปภาคผนวกที่ จ.7 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน



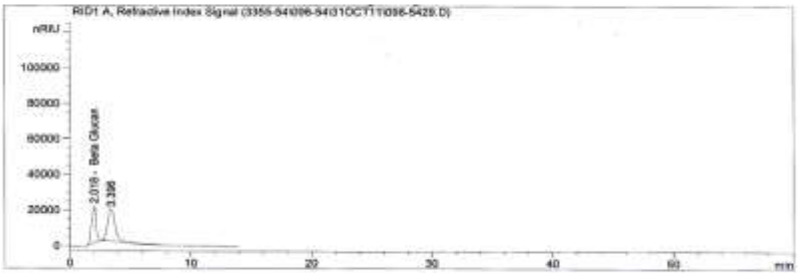
รูปภาคผนวกที่ จ.8 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง S3 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน



รูปภาคผนวกที่ จ.9 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง Y1 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน



รูปภาคผนวกที่ จ.10 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง Y2 ที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

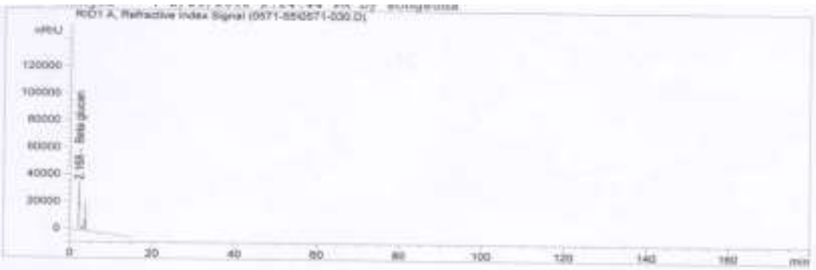


รูปภาคผนวกที่ จ.11 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเส้นใยเห็ดแครง Y3 ที่เพาะ เลี้ยงบนอาหารเหลวเอสพีบีดี ในสภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

รูปภาคผนวกที่ จ.12 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 60 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.13 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 90 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.14 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 110 องศา เซลเซียส120 นาที



รูปภาคผนวกที่ จ.15 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 60 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.16 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 90 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.17 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 120 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.18 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 60 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.19 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 90 นาที

รูปภาคผนวกที่ จ.20 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร β-glucan ของเห็ดแครง S2 ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสภาวะที่เหมาะสม สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 120 นาที

ภาคผนวก ฉ

เอกสารที่นำเสนอและตีพิมพ์ของงานวิจัย

1.

2.

3.

การส่งเสริมการผลิตเส้นใยและสารโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) โดยสภาวะของสารอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

Enhancement of Mycelial and Polysaccharide Production from *Schizophyllum commune* by Optimization of Culture Medium

สุวิทย์ สุวรรณโณ[1*], ไซนะ มูเล็ง[2]
Suvit Suwanno[1*], Saina Mulang[2]

Received: 12 September 2011; Accepted: 27 October 2011

บทคัดย่อ

งานวิจัยเน้นทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตเส้นใยเห็ดแครงและสารโพลิแซคคาไรด์โดยแปรผันองค์ประกอบของสารอาหาร พบว่าสูตรอาหารแข็งเอสพีบีดีประกอบด้วยมันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม วิตามินบี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม เด็กซ์โตรส 20 กรัม และวุ้น 15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร (Sweet potato, Peptone, Vitamin B_6, $CaCl_2$, Dextrose, Agar: SPBD) สามารถเพิ่มผลผลิตเส้นใยเห็ดแครงได้ โดยเส้นใยเห็ดแครงที่ผลิตได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 7.07 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ลักษณะของเส้นใยเห็ดสีขาวฟู มีความหนาแน่น ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ (Potato Dextrose Agar: PDA) เส้นใยเห็ดแครงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 2.67 เซนติเมตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในสูตรอาหารเหลวเอสพีบีดีในที่มืดสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 16 วัน พบว่าสามารถผลิต ชีวมวลสูงสุด 1.83 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ 171.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวพีดีบี (Potato Dextrose Broth: PDB) เห็ดสามารถผลิตชีวมวลได้ 1.53 กรัมต่อลิตร และผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้ 52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ: เห็ดแครง เบต้ากลูแคน การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

Abstract

The purpose of this research was to enhance the mycelial and intracellular polysaccharide production from *Schizophyllum commune* by variation of medium compositions. The result showed that the optimized agar medium which was composed of sweet potato 250 g, peptone 1 g, vtamin B_6 0.5 g, $CaCl_2$ 1.3 g, dextrose 20 g and agar 15 g per liter of water (SPBD) was able to enhance the mycelial production. The diameter of mycelial was 7.07 cm when cultivated in the dark at 25°C for 6 days. These mycelial showed white color swollen and dence, while the mycelial which cultivated on potato dextrose agar (PDA) had only 2.67 cm of diameter. When the *Schizophyllum commune* mycelia were cultivated on SPBD medium broth in the dark under static condition at 25°C for 16 days, they produced highest biomass at 1.83 g/L and the polysaccharide at 171.52 *m*g/g-dryweight.

---

[1] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์*, [2] *นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112*

[1] *Assistant Professor*, [2] *Graduate student, Environmental Technology, Environmental Biotechnology Research Unit, Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112.*

* *Corresponding author: Suvit Suwanno, Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90112. E-mail: suvit.su@psu.ac.th*

In contrast, the culture cultivated on potato dextrose broth (PDB) produced only 1.53 g/L of biomass and 52 mg/g-dryweight of polysaccharide.

Keyword: *Schizophyllum commune*, β -glucan, submerged culture

บทนำ

เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เป็นเห็ดกินได้ สามารถพบได้โดยทั่วไปตามไม้เนื้อแข็งที่ตายแล้วในช่วงฤดูฝนหรือในสภาวะที่มีความชื้นเหมาะสม เป็นเห็ดมีคุณค่าทางอาหารสูง มีสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด เช่น โปรตีน ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส และแคลเซียม[1] นอกจากนี้เห็ดแครงยังเป็นแหล่งสาร โพลิแซคคาไรด์ที่สำคัญซึ่งมีคุณสมบัติทางยาได้แก่ เบต้ากลูแคนหรือมีชื่อจำเพาะว่า Schizophyllan เป็น โพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า โดยตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 ของน้ำตาลกลูโคสตัวแรกจะเชื่อมต่อกับคาร์บอนตัวที่ 3 ของน้ำตาลกลูโคสตัวที่สองของสายโซ่หลักได้เป็น β-1-3-glucan และเชื่อมต่อกับ β-1-6-glucan ซึ่งเป็นสายโซ่ข้าง คุณสมบัติสำคัญของเบต้ากลูแคน คือการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายส่งผลให้ร่างกายสามารถต่อสู้หรือป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น ดังนั้น เบต้ากลูแคนจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารเสริมสุขภาพหรือใช้เป็นยาเพื่อป้องกันและยับยั้งโรคร้ายแรงต่างๆ เช่น ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer) ยับยั้งการติดเชื้อ (Anti-infect) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเอดส์ (HIV) มีงานวิจัยหลายฉบับยืนยันว่าเบต้ากลูแคนยังช่วยเสริมและเพิ่มความสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ปัจจุบันประเทศที่ผลิตสารเบต้ากลูแคนเป็นการค้าได้แก่ ประเทศจีนและญี่ปุ่น เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง[2-4] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเห็ดแครงยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระป้องกันการเกิดรอยเหี่ยวย่นก่อนวัยได้อีกด้วย[5]

เนื่องจากเห็ดที่พบในธรรมชาติทั่วไป หรือจากการเพาะเห็ดบนวัสดุเพาะ ต้องใช้เวลาหลายเดือนในการเกิดดอกเห็ด และการควบคุมคุณภาพของดอกเห็ดในระหว่างการเพาะเลี้ยงค่อนข้างทำได้ยาก เช่น การควบคุมแมลงและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ รวมทั้งการสะสมของโลหะหนักชนิดต่างๆ เช่น แคดเมียม ทองแดง สารหนู และปรอท เป็นต้น ซึ่งปนเปื้อนมากับดิน วัสดุเพาะ และจากการใช้สารเคมีควบคุมแมลงและจุลินทรีย์[6] ทำให้คุณภาพของดอกเห็ดที่จะป้อนเข้าสู่กระบวนการสกัดสารเบต้ากลูแคนไม่ได้คุณภาพเช่นกัน ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เบต้ากลูแคนทางการค้านิยมเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว ทั้งนี้เนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยการเพาะเลี้ยงต่างๆ ได้ง่าย และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเห็ดบนวัสดุเพาะ[7-8] สำหรับเห็ดแครงก็ประสบปัญหาเช่นเดียวกับเห็ดสมุนไพรชนิดอื่นๆ คือการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งต้องใช้เวลานาน และยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และโลหะหนัก แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวก็มีข้อจำกัดของสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีราคาแพง และส่วนใหญ่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรที่สำคัญบางชนิดเท่านั้น[9-10] นอกจากนี้ยังพบว่ามีงานวิจัยจำนวนน้อยที่ศึกษาเกี่ยวกับสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อเพิ่มผลผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์ชนิดที่ผลิตภายในเซลล์[11]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่ศึกษาสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตชีวมวลทั้งในอาหารแข็ง และอาหารเหลว รวมทั้งการส่งเสริมการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ที่ผลิตภายในเซลล์สำหรับเชื้อเห็ดแครงสายพันธุ์ที่พบในท้องถิ่นภาคใต้ ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวภายใต้สภาวะนิ่ง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนากระบวนการผลิตชีวมวลเห็ดแครงในอาหารเหลว เพื่อการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สาร Schizophyllan และสารต้านอนุมูลอิสระในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

1. เชื้อเห็ดแครง

เชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์ได้จากการแยกเชื้อเห็ดจากแหล่งธรรมชาติที่ได้จากอำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยการฟอกฆ่าเชื้อดอกเห็ดด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที ตัดแต่งเนื้อเยื่อดอกเห็ดส่วนที่โดนแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เหลือให้เป็นชิ้นเล็กๆ วางบนอาหารแข็ง พีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญ แล้วทำการเขี่ยเชื้อบนอาหารชนิดเดียวกันซ้ำหลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาตัวอย่างเชื้อเห็ดในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป[12]

2. อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ

อาหารพีดีเอประกอบด้วยมันฝรั่ง 200 กรัม เด็กซ์โตรส 20 กรัม และวุ้น 15 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เพื่อใช้แยกเชื้อเห็ดแครงและเป็นสูตรอาหารควบคุมเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวลและการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาผลและปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

1.1 ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนธรรมชาติ โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนจากพืชที่มีในท้องถิ่น 3 ชนิด ได้แก่ มันเทศ ข้าวโพด และเผือก เพื่อใช้ทดแทนมันฝรั่งในสูตรอาหารพีดีเอ ซึ่งเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้เป็นชุดควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารพีดีเอเป็นเวลา 7 วัน ด้วยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดแครงตรงบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใย แล้วย้ายไปเพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้นของแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง บ่มที่สภาวะมืด อุณหภูมิ25 องศาเซลเซียส วัดอัตราการเจริญของเส้นใยจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 8 วัน

1.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนธรรมชาติ จากผลการทดลองที่ให้ผลดีดังหัวข้อ 1.1 มาแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็น 4 ระดับ คือ 150, 200, 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยใช้ชุดควบคุม วิธีในการเพาะเลี้ยง และการเก็บข้อมูลเช่นเดียวกับข้อ 1.1

2. ศึกษาผลและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

2.1 ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนจำนวน 4 แหล่ง (แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน ยีสต์สกัด และสกิมมิล) เติมแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ลงในสูตรอาหารพื้นฐานที่เลือกได้ในข้อ 1.2 และใช้อาหารพีดีเอเป็นชุดควบคุม

2.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจน จากผลการทดลองที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนเป็น 5 ระดับคือ 1, 3, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร วิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดและการเก็บข้อมูลเช่นเดียวกันกับข้อ 1.1

3. ศึกษาผลและปริมาณของแหล่งวิตามินต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

3.1 ศึกษาผลของแหล่งวิตามิน ใช้แหล่งวิตามิน 2 แหล่งได้แก่ วิตามินซี และวิตามินบี 6 ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยเติมลงในสูตรอาหารพื้นฐานที่เลือกได้จากข้อ 2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเส้นใยเห็ดแครง

3.2 ศึกษาปริมาณของแหล่งวิตามิน ใช้แหล่งวิตามินที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 เพื่อศึกษาปริมาณของวิตามินต่อการผลิตเส้นใยเห็ดแครงจำนวน 4 ระดับ (0.5, 0.7, 0.9 และ 1.1 กรัมต่อลิตร) สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยและการเก็บข้อมูลกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1

4. ศึกษาผลและปริมาณของแหล่งแร่ธาตุต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

4.1 ศึกษาผลของแหล่งแร่ธาตุ ใช้แร่ธาตุ 3 แหล่ง คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และโปแตสเซียม-คลอไรด์ ปริมาณแหล่งละ 0.7 กรัมต่อลิตรเติมลงในสูตรอาหารพื้นฐานที่ได้จากข้อ 3.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเส้นใยของเห็ดแครง

4.2 ศึกษาผลของปริมาณแร่ธาตุ ซึ่งใช้ข้อมูลของแหล่งแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ดจากข้อ 4.1 โดยแปรผันปริมาณของแร่ธาตุดังกล่าว 4 ระดับ คือ 0.7, 0.9,1.1 และ 1.3 กรัมต่อลิตร สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงและการเก็บข้อมูลทำเช่นเดียวกับชุดการทดลองก่อนหน้านี้

5. ศึกษาประสิทธิภาพของสูตรอาหารต่อการผลิตชีวมวลและโพลิแซคคาไรด์

เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงที่มีอายุ 7 วัน จำนวน 2 ชิ้น (เจาะด้วย cork borer) ในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 4.2 บ่มในที่มืดสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างชีวมวลเห็ดแครงที่ผลิตได้ทุก ๆ 2 วันเป็นเวลา 16 วัน เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์จะวิเคราะห์จากตัวอย่างชีวมวลที่อัตราการเจริญสูงสุด

การสกัดและการวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์

1. การสกัดสารโพลิแซคคาไรด์

ใช้ชีวมวลเห็ดแครงที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze drying) จำนวน 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที บดตัวอย่างที่ได้ด้วยซิลิกา (Silicon dioxide) 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้สารละลายใสส่วนที่ 1 สำหรับกากตะกอนเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที

ส่วนของสารละลายใสที่ได้จะรวมกับสารละลายใสส่วนที่ 1 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 4 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในส่วนของตะกอนที่เหลือ ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบเช่นเดียวกับการสกัดด้วยน้ำ จะได้สารละลายใสส่วนที่ 2 และทำการสกัดกากตะกอนซ้ำด้วยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง นำส่วนใสที่ได้รวมกับส่วนใสจากการสกัดด้วยด่างในส่วนที่ 2 ดัดแปลงจากวิธีของ Suwanno และคณะ[13]

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์

วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์จากสารสกัดทั้งสกัดด้วยน้ำและด่าง โดยวิธี Phenol-sulfuric[14] (ใช้กลูโคสอยู่ในช่วง 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (JASCO รุ่น 7800) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำและวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. ผลของแหล่งและปริมาณคาร์บอนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนธรรมชาติ (มันฝรั่ง มันเทศ ข้าวโพด และเผือก) ต่ออัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารวุ้น พบว่าสูตรอาหารที่ใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเส้นใยในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยให้เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 4.63 เซนติเมตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 6 วัน (Figure 1) ทั้งนี้เนื่องจากที่เวลาการเพาะเลี้ยง 8 วันเส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตเต็มจานอาหารจึงไม่สามารถแสดงผลได้ว่าแหล่งคาร์บอนชนิดใดเส้นใยเห็ดจะเจริญเติบโตได้ดีกว่า ลักษณะของเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงโดยใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีลักษณะของเส้นใยที่ฟู และขยายวงกว้างมากกว่าเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงโดยใช้มันฝรั่ง ข้าวโพด และเผือกเป็นแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับงานวิจัยของ นิภาพร อามัสสา และนิวัฒ เสนาะเมือง[15] ที่ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งบนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ ได้แก่พีดีเอ (Potato Dextrose Agar) พีเอ็มพีเอ (Potato Dextrose Malt Peptone Agar) ซีดีเอ็มพีเอ (Cas-sava Dextrose Peptone Agar) อาร์บีดีเอ็มพีเอ (Rice-brand Dextrose Malt Peptone Agar) และเอสพีเอ็มพีเอ (Sweet-potato Malt Peptone Agar) พบว่าเส้นใยเห็ดแครงสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีเอ็มพีเอ ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากมันเทศมีปริมาณน้ำตาลสูง ซึ่งเชื้อเห็ดต้องการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน[16]

1.2 ผลของปริมาณมันเทศต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง พบว่าสูตรอาหารที่ใช้มันเทศเป็น แหล่งคาร์บอนปริมาณ 250 กรัมต่อลิตร จะให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 5.73 เซนติเมตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 6 วัน เส้นใยเห็ดที่ได้มีลักษณะขาวฟูมีความหนาแน่นและขยายวงกว้างมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่ใช้มันเทศ 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.50, 5.00 และ 5.37 เซนติเมตร ตามลำดับ (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

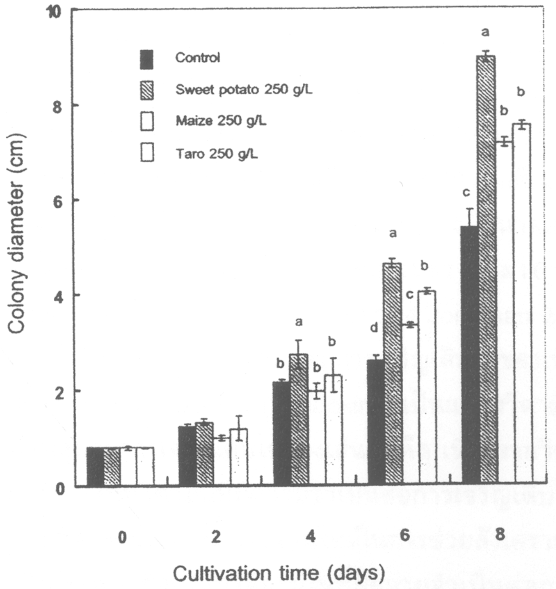


Figure 1 Effect of different carbon sources on colony diameter of *Schizophyllum commune*. Different letters within same cultivation time (a row) are significant different ($P \leq 0.05$). Values are mean ± SD, n=3.

2. ผลของแหล่งและปริมาณไนโตรเจนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

2.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง พบว่าเส้นใยเห็ดแครงจะมีการเจริญเติบโตได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน (1 กรัมต่อลิตร) และใช้มันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 250 กรัมต่อลิตร จะให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 6.80 เซนติเมตร ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 วัน สำหรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเส้นใยที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แสดงข้อมูลใน Figure 2 เส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงโดยใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนลักษณะของเส้นใยจะฟูขาว และขยายวงกว้างมากกว่าเส้นใยที่เพาะเลี้ยงโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด และสกิมมิลเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Lin และ Sung[17] ที่ศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงเห็ด *Antrodia cinnamomea* ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการผลิตสารโพลิแซค คาไรด์ จากงานวิจัยพบว่าเส้นใยเห็ดสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วน Elisashvili และคณะ[18] พบว่า เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ของเห็ด *Agaricus nevoi* เช่นกัน

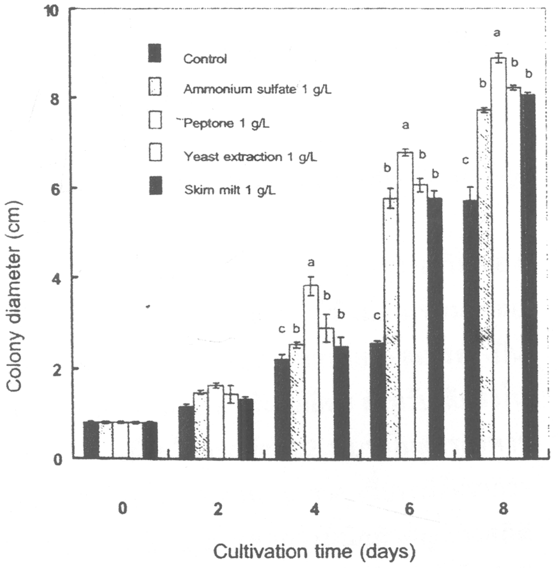


Figure 2 Effect of different nitrogen sources on colony diameter of *Schizophyllum* commune. Different letters within same cultivation time (a row) are significant different ($P \leq 0.05$). Values are mean ± SD, n=3.

2.2 ผลของปริมาณเปปโตนต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง พบว่าอาหารที่ใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้เท่ากับ 6.77 เซนติเมตร ที่เวลา 6 วัน ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงของอาหารที่ใช้เปปโตนปริมาณ 3, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 6 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 6.07, 5.80, 5.53 และ 5.17 เซนติเมตร ตามลำดับ ลักษณะของเส้นใยมีสีขาวฟู มีความหนาแน่นเกาะติดบนอาหารวุ้น โดยเฉพาะเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงโดยใช้เปปโตน 1 กรัมต่อลิตร จะมีลักษณะของเส้นใยฟูและขยายวงกว้างมากกว่า (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

3. ผลของแหล่งและปริมาณวิตามินต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

3.1 ผลของแหล่งวิตามินต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง จากผลการทดลองใช้วิตามินซีและวิตามินบี 6 ชนิดละ 0.5 กรัมต่อลิตร เติมลงในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยมันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม เด็กซ์โตรส 20 กรัม และวุ้น 15 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตรเปรียบเทียบกับอาหารพีดีเอ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมวิตามินบี 6 จะให้อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงสูงกว่าการเติมวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 7.00 เซนติเมตร ในขณะอาหารที่เติมแหล่งวิตามินซี เส้นใยจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 6.30เซนติเมตร ที่เวลา 6 วัน (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jonathan และคณะ[19] ที่ศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญเติบโตของเห็ดแครง พบว่าวิตามิน บี 6 (Pyridoxine) เป็นแหล่งวิตามินที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด เนื่องจากวิตามินบี 6 เป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเห็ดโดยมีหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในการช่วยสังเคราะห์ทริปโตเฟน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต และวิตามินบี 6 ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดมี 3 ชนิดคือ ไพริดอกซิน ไพริดอกซอล และ ไพริดอกซามีน

3.2 ผลของปริมาณวิตามินบี 6 จากการศึกษาระดับของวิตามินบี 6 จำนวน 4 ระดับต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง พบว่าการใช้วิตามินบี 6 ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร เส้นใยเห็ดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p≤0.05$) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 7.07 เซนติเมตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 6 วัน ลักษณะของเส้นใยเห็ดมีสีขาวฟู มีความหนาแน่น เกาะติดบนจานอาหาร และขยายวงกว้างมากกว่า ส่วนแหล่งอาหารที่เติมวิตามินบี 6 ปริมาณ 0.7, 0.9 และ 1.1 กรัมต่อลิตร เส้นใยเห็ดแครงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 6.13, 5.60 และ 5.47 เซนติเมตร ตามลำดับ (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

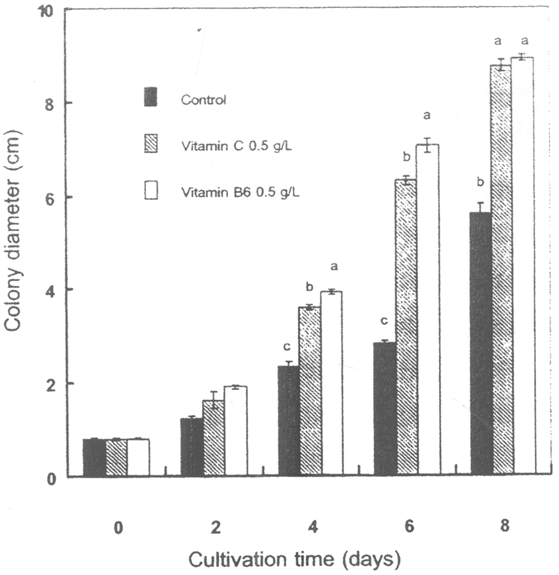


Figure 3 Effect of different vitamins on colony diameter of *Schizophyllum commune*. Different letters within same cultivation time (a row) are significant different ($p≤0.05$). Values are mean ± SD, n=3.

4. ผลของแหล่งและปริมาณแร่ธาตุต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง

4.1 ผลของแหล่งแร่ธาตุต่ออัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง จากการศึกษาการใช้แมกนีเซียม คลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และโปแตสเซียมคลอไรด์ เป็นแหล่งแร่ธาตุที่ปริมาณ 0.7 กรัมต่อลิตร สำหรับเติมลงในสูตรอาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 พบว่าในสูตรอาหารที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งแร่ธาตุ เชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p≤0.05$) ด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ที่เวลา 6 วัน เชื้อเห็ดแครงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 7.37 เซนติเมตร (Figure 4) และลักษณะของเส้นใยซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ และโปแตสเซียมคลอไรด์ เส้นใยจะมีสีขาวฟู โดยเฉพาะอย่างยิ่งเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์เส้นใยมี สีขาวฟู มีความหนาแน่น เกาะติดแน่นบนอาหารวุ้น และขยายวงมากกว่าสูตรอาหารอื่น (Figure 5) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hwang และคณะ[20] ที่ศึกษาผลของแหล่งแร่ธาตุต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด *Phellinus lintius* พบว่าเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งแร่ธาตุ จะมีการเจริญและสร้างเส้นใยได้ดีที่สุดเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์ที่เติมในสูตรอาหารจะมีผลทำให้ความดัน ของสารละลายที่ไหลผ่านเนื้อเยื่อ (Osmotic pressure) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตและขยายความยาวของเส้นใยเห็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งตรงบริเวณส่วนปลายของเส้นใย นอกจากนี้ยังส่งเสริมให้เซลล์สังเคราะห์สารโพลิเมอร์เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน[21,22] สำหรับการเจริญของเชื้อที่เวลา 8 วัน พบว่าการเจริญของเส้นใยไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากเส้นใยเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารจึงไม่สามารถแสดงผลที่แตกต่างกันได้ เช่นเดียวกับการทดลองปัจจัยการเจริญอื่น ๆ ก่อนหน้านี้

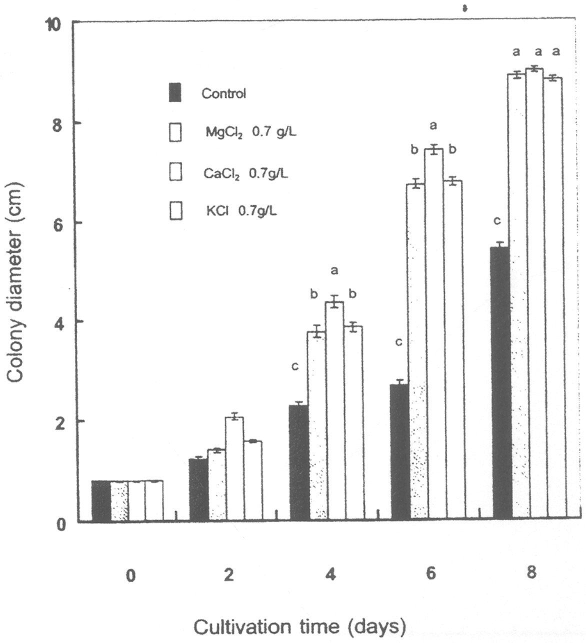


Figure 4 Effect of different mineral elements on colony diameter of *Schizophyllum commune*. Different letters within same cultivation time (a row) are significant different ($p≤0.05$). Values are mean ± SD, n=3.

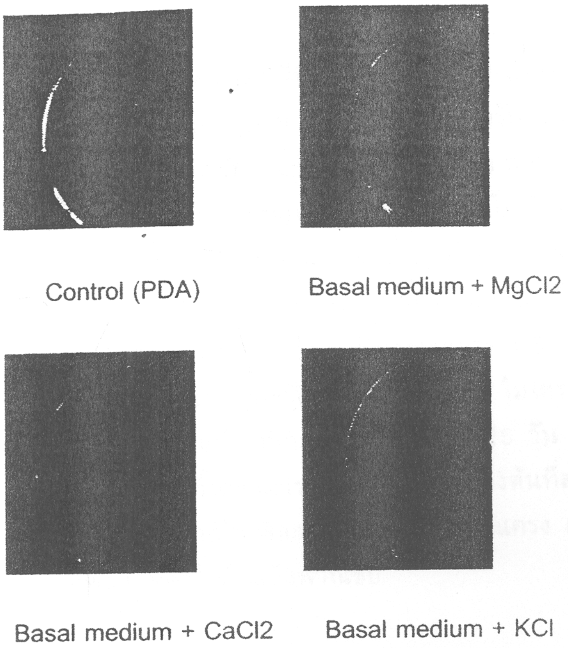


Figure 5 Characteristic of *Schizophyllum commune* mycelia cultivated on different mineral elements for 6 days.

4.2 ผลของปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง พบว่าในอาหารที่ใช้แคลเซียมคลอไรด์ปริมาณ 1.3 กรัมต่อลิตร เส้นใยเห็ดมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากการวัดการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เส้นใยเห็ดแครงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.13 เซนติเมตร ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 0.7, 0.9 และ 1.1 กรัมต่อลิตร เวลาการเพาะเลี้ยง 6 วัน เส้นใยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 7.43, 7.57 และ 7.67 เซนติเมตร ตามลำดับ (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

5. ผลของประสิทธิภาพสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลและสารโพลิแซคคาไรด์ในสภาวะนิ่ง

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหารเหลว เอสพีดีบี ประกอบด้วยมันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม วิตามิน บี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม เด็กซ์โตรส 20 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร เปรียบเทียบกับอาหารเหลวพีดีบี (มันฝรั่ง 20 กรัม และเด็กซ์โตรส 20 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) เพาะเลี้ยงในที่มืดสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน พบว่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดแครงเริ่มคงที่ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตร โดยเชื้อให้ปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1.83 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเอสพีดีบี และ 1.53 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารพีดีบี (Figure 6) การวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดแครงพบว่าเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเหลวเอสพีบีดีให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ 171.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่อาหารเหลวสูตรพีดีบีเชื้อให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ 51.96 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเอสพีบีดี ล้วนเป็นสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดแครงได้แก่ มันเทศ[15] เปปโตน[18] วิตามินบี6[19] แคลเซียมคลอไรด์[21,22] จึงทำให้เส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดีสามารถเจริญเติบโตและผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ได้ดีกว่าอาหารเหลวพีดีบี ดังนั้นสูตรอาหารใหม่ที่ได้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตชีวมวลเห็ดแครงเพื่อการสกัดและผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ในเชิงพาณิชย์ หรือสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับแหล่งคาร์บอนธรรมชาติที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อพัฒนาต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง และในขณะเดียวกันก็เป็นแนวทางในการจัดการของเสียชีวภาพที่ถูกวิธีและเหมาะสมอีกทางหนึ่งด้วย แต่อย่างไรก็ตามจะต้องศึกษาสภาวะการควบคุมการผลิตในถังหมักอีกครั้งหนึ่งด้วยเช่นกัน

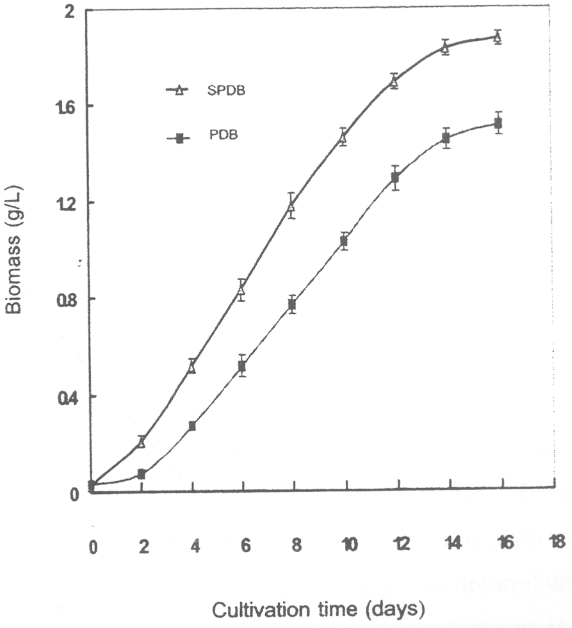


Figure 6 Biomass of *Schizophyllum commune* cultivated in SPDB and PDB media in the dark and static condition at 25°C for 16 days. Each value is mean ± SD, n=3.

สรุปผล

สูตรอาหารเหลวเอสพีบีดีซึ่งประกอบด้วย มันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม วิตามินบี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม และเด็กซ์โตรส 20 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเส้นใยเห็ดแครงได้สูงสุด 1.83 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้ 171.52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเทียบกับอาหารเหลวพีดีบีเชื้อให้ปริมาณชีวมวล 1.53 กรัมต่อลิตร และผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้ 52 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 16 วัน ซึ่งสูตรอาหารใหม่ที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง และสารโพลิแซคคาไรด์ในเชิงพาณิชย์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยและพัฒนา ที่สนับสนุนทุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2552 ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bolla, K., Shaheen, S. Z., Vasu, K. and Singara Charya, M. A. Effect of oils on the production of exopolysaccharides and mycelial biomass in submerged culture of *Schizophyllum commune*. African Journal of Microbiology Research 2008; 2:349-52.
2. สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ. การผลิตน้ำเห็ดสมุนไพรพร้อมดื่ม. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 2553; 20(2):278-88.
3. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 2002;60:258-74.
4. Liu, G-Q. and Zhang, K-C. Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst.: A new understanding. Journal of Integrative Plant Biology 2005; 47(2):129-35.
5. Kitamura, S., Hirono, T., Takea, K., Fukada, H., Takahashi, K., Falch, B., and Stokke, B. Conformation transition of Schizophyllan in aqueous alkaline solution. Biopolymer 1996;39 (3):407-16.
6. Shu, C-H. and Xu, C-J. Medium optimization for producing bioactive exopolysaccharides by *Agaricus brasiliensis* S. Wasser *et al.* (=*A. balazei* Murrill ss. Heinem) in submerged culture. Food Technology and Biotechnology 2007;45(3):327-33.
7. Lung, M-P., and Huang, P-C. Optimization of expolysaccaride production from *Armillaria mellea* in submerged cultures. Leters in Applied Microbiology 2010;50:198-204.
8. Papaspyridi, L-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E. Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fiber content by *Pleurotus osteatus* ATHUM 4438 under submerged culture. Biochemical Engineering Journal 2010;50:131-8.
9. Hsieh, C., Hsu, T-H. and Yang, F-C. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. Process Biochemistry 2005;40:909-16.
10. Yang, H. and He, G. Influence of nutritional conditions on exopolysaccharide production by submerged cultivation of medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. World Journal Microbiology and Biotechnology 2008;24: 2903-07.
11. Kumari, M.A., Shrikant A. Survase. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. Bioresource Technology 2008;99(5): 1036–43.
12. Stamets, P. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Berkeley, California: Ten Speed Press; 2000. p.79-108. 13. Suwanno, S., Nakamura, K., Amano,Y., Shida, M. and Horiuchi, I. Development of the method for efficient disruption and rapid extraction on the *b*-l-3 glucan determination from the mycelium of *Ganoderma lucidum*. Mushroom Science and Biotechnology 2005;13(2):83-93.
14. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance.

Analytical Biochemistry 1956; 28(3):350-6.

15. นิภาพร อามัสสา และนิวัฒ เสนาะเมือง. ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 2548;10(4):311-21.
16. สมศรี ประพฤติธรรม กัลยาณี ตันติธรรม จุฬาภรณ์ เลิศบวรวงศ์ นรินทร์ พูลเพิ่ม และชำนาญ ทองกลัด. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในมันเทศพันธุ์ต่างๆ.วารสารวิชาการเกษตร 2530;5(1):10-3.
17. Lin, E-S. and Sung, S-C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. International Journal of Food Microbiology 2006;108:182-78.
18. Elisashvili V.I., Kachlishvili E.T. and Wasser, S.P. Carbon and nitrogen source effects on Basidiomycetes exopolysaccharide production. Applied Biochemistry and Microbiology 2009; 45(5):531-5.
19. Jonathan, S.G. and Fasidi, I.O. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyluum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. Food Chemistry 2001;75:303-7.
20. Hwang, H-J., Kim, S-W., Choi, J-W. and Yun, J-W. Production and characterization of expolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. Enzyme and Microbial Technology 2003;33:309-19.
21. Madi, N., McNeil, B. and Harvey, M. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasdium pullulans*. Enzyme and Microbial Technology 1996; 21:102-7
22. Charddonnet, C.O., Sams, C.E. and Coway, W.S. Calcium effect on the mycelial cellwalls of *Bortrytis cinerea*. Phytochmistry 1999;52: 967-73

การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน เพื่อผลิตชีวมวลเห็ดแครง

Utilization of Empty Fruit Bunches and Oil Palm Fronds Waste for *Schizophyllum commune* Biomass Production

ไชนะ มูเล็ง และสุวิทย์ สุวรรณโณ*

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสิ่งแวดล้อม คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

*E-mail: suvit.su@psu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน สำหรับเป็นวัสดุเพาะเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ผลการทดลอง พบว่า เห็ดแครง S1, S2 และ Y3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยเท่ากัน คือ 9.0 เซนติเมตร และมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ในช่วง 261.08-302.02 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเอสพีบีดี ที่สภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ไอโซเลต บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 21.86 : 1.15 (19) โดยใช้ยูเรีย พบว่าเชื้อเห็ดแครง S2 ให้ค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา (biological efficiency : BE) ร้อยละ 8.96 น้ำหนักเฉลี่ยของดอกเห็ดสดเท่ากับ 1.35 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ดอกเห็ดมีสีขาวนวล ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 33 วัน

คำสำคัญ: ทะลายปาล์มเปล่า ทางใบปาล์มน้ำมัน เห็ดแครง ชีวมวล โพลิแซคคาไรด์

Abstract

This research studied the utilization of empty fruit bunches and oil palm fronds waste as a substrate material for the cultivation of *Schizophylum commune* 9 isolates. The results showed that *Schizophyllum commune* S1, S2 and Y3 had the same colony diameter at 9.0 cm. They yielded the maximum polysaccharide content in the range 261.08-302.02 µg/g dry-weight when cultivated on SPBD medium in dark conditions at 25 °C for 12 days. After the 3 isolates of *Schizophyllum commune* were cultivated on mixed substrate of empty fruit bunches and oil palm fronds (70:30) with an initial moisture content of 60 percentage and the C/N ratio was adjusted to 21.86:1.15 (19) by adding urea, the *Schizophyllum commune* S2 provided a maximum biological efficiency (BE) of 8.96 percentage and the average fresh weight of fruit body was 1.35 g/100 g substrate. White fruiting body was observed at 33 days of cultivation time.

Keywords: Empty fruit bunches, Oil palm fronds, *Schizophyllum commune*, Biomass, Polysaccharide

1.บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส เป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน จัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสที่เกิดจากกระบวนการผลิตปาล์มน้ำมัน ได้แก่ ทางใบปาล์ม

น้ำมันซึ่งมีปริมาณสูงถึง 2,400,000 ตันต่อปี และทะลายปาล์มเปล่า มีปริมาณสูงถึง 2,000,000 ตันต่อปี ทะลายปาล์มเปล่าที่เหลือทิ้งถูกกองทิ้งไว้จะมีน้ำมันหลงเหลืออยู่ เมื่อฝนตกน้ำมันจะถูกชะล้างออกมาปะปนกับน้ำฝนไหลลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในแหล่งน้ำ ปัจจุบันมีการจัดการวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลิตพลังงาน เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ และใช้เป็นวัสดุในการเพาะเห็ดฟางในระดับครัวเรือน เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเห็ดในปริมาณสูง[1], [2]

เห็ดแครงเป็นเห็ดกินได้ มีคุณค่าทางอาหารสูง มีสารโพลิแซคคาไรด์ที่สำคัญ คือ เบต้ากลูแคน (β-glucan) ชื่อเฉพาะว่า Schizophyllan ซึ่งมีคุณสมบัติทางเภสัชศาสตร์ ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้มีการนำสารสกัดจากเห็ดแครง ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง และอาหารเสริม [3],[4],[5],[6] โดยปกติแล้วสามารถพบเห็ดแครงได้ในแหล่งธรรมชาติทั่วไปที่มีความชื้นสูง ๆ แต่เมื่อทรัพยากรป่าไม้ลดลงก็พบเห็ดแครงน้อยลงเช่นเดียวกัน และสามารถบริโภคเห็ดแครงได้เฉพาะฤดูกาลเท่านั้นทำให้ต้องรอระยะเวลานาน ประกอบกับวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดแครงโดยทั่วไป คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา ซึ่งหายากและมีราคาแพง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันมาใช้ประโยชน์ เพื่อใช้เป็นวัสดุทางเลือกสำหรับการเพาะเห็ดแครง ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้ง และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง ทั้งนี้เนื่องจากวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวมีปริมาณมากในปัจจุบัน และยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อม

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ตัวอย่างเห็ด

ตัวอย่างเห็ดแครงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ใน 3 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด พัทลุง สงขลา และ ยะลา จังหวัดละ 3 ตัวอย่าง

2.2 การแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และการทดสอบอัตราการเจริญ

แยกเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีของ Kumari และคณะ [7] ทดสอบอัตราการเจริญ โดยใช้อาหารแข็ง เอสพีบีดี (Sweet potato, Peptone, Vitamin B_6, $CaCl_2$, Dextrose, Agar: SPBD) ประกอบด้วยมันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม น้ำตาลเด็กโตรส 20 กรัม วิตามินบี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม วุ้น 20 กรัมต่อปริมาณน้ำ 1 ลิตร [8]

2.3 การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงใน ฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลวเอสพีบีดี (SPBD Broth) จำนวน 100 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่สภาวะมืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มฟลาสก์ เก็บตัวอย่างกรองด้วยตะแกรง และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์ต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์

สกัดสารโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างเห็ดแครงตามวิธีของ Suwanno และคณะ [9] สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์ใช้วิธี Phenol-Sulfuric Colorimetric [10]

2.5 การเตรียมวัสดุเพาะ

1) การเตรียมทะลายปาล์ม

นำทะลายปาล์มเปล่ามากองสุมและรดน้ำให้ความชื้นเป็นเวลา 1 เดือน เพื่อให้จุลินทรีย์ในธรรมชาติช่วยย่อยสลายทะลายปาล์มเปล่าให้อยู่ในสภาพที่เชื้อเห็ดแครงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย อบแห้งที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ และตัดให้มีขนาด 2-5 เซนติเมตร ตัวอย่างบางส่วนนำไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และไนโตรเจนโดยวิธี Photometric Method ตามวิธีของ Robert และคณะ [11]

2) การเตรียมทางใบปาล์ม

ตัดทางใบปาล์มให้มีขนาด 2 - 5 เซนติเมตร อบแห้งที่อุณหภูมิ 70 - 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ ตัวอย่างบางส่วนนำไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนและไนโตรเจน เช่นเดียวกับทะลายปาล์ม

2.6 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นดัดแปลงจากวิธีของ Philippoussis และคณะ[12] โดยนำเมล็ดข้าวเปลือกมาต้มสุกประมาณ 1 ชั่วโมงจนเมล็ดข้าวเริ่มแตก รอจนเมล็ดข้าวเย็นตัวแล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกชนิด ทนร้อน (Polypropylene, PP) จำนวน 200 กรัม นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วถ่ายเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ (อายุ 7 วัน) ลงบนเมล็ดข้าวเปลือกจำนวน 4 ชิ้น บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญทั่วเมล็ดข้าว

2.7 ศึกษาผลของอัตราส่วนทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน

ผสมวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมันอัตราส่วน 100:0, 90:10, 80:20, 70:30 และ 60:40 ปรับความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 80 บรรจุใส่ถุงพลาสติก (PP) ถุงละ 47.5 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้เย็น แล้วเติมหัวเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกเป็นเวลา 10วัน ปริมาณร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน เพื่อหาน้ำหนักแห้งของชีวมวล (คิดจากค่าผันแปรของน้ำหนักแห้งที่ลดลงของวัสดุเพาะ) จนเส้นใยเจริญได้เต็มวัสดุเพาะ นำไปเปิดดอกเพื่อหาค่าประสิทธิภาพทางชีววิทยา (Biological efficiency: BE) ตามวิธีของ Mandeel และคณะ [13] (สมการที่ 1)

$$BE (\%) = \frac{\text{Weight of fresh mushroom fruiting bodies}}{\text{Weight of dry substrate}} \times 100 \quad (1)$$

2.8 ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นวัสดุเพาะต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

เลือกอัตราส่วนที่ดีที่สุดจากผลการศึกษาอัตราส่วนทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน มาปรับความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะให้อยู่ในช่วงร้อยละ 50, 60, 70 และ 80 (ชุดควบคุม) การทดลองและเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 2.7

2.9 ศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครง

ปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) ของวัสดุเพาะที่เลือกได้จากผลการทดลองข้อ 2.8 ให้เท่ากับ 21.86:1.15 (19), 21.86:1.04 (21) และ 21.86:0.95 (23) ด้วยการคำนวณอัตราส่วน C/N ตามวิธีของ Cruz และคณะ [14] โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (C/N= 0:46.6) เติมลงในวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน 70:30 (C/N= 21.86:0.94) สำหรับวิธีการเพาะเลี้ยงและเก็บตัวอย่าง

ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้

2.10 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง โดยวิธี LSD (Lėast Significant Difference)

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์และการทดสอบอัตราการเจริญ

เห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ดซึ่งเก็บจากแหล่งธรรมชาติใน 3 จังหวัดภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทยได้แก่ พัทลุง (P1, P2, P3) สงขลา (S1, S2, S3) และยะลา (Y1, Y2, Y3) จากการทดสอบอัตราการเจริญ พบว่าเชื้อเห็ดแครงส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแข็งเอสพีบีดี โดยที่เชื้อ S1, S2 และ Y3 สามารถเจริญและสร้างเส้นใยจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 9.0 เซนติเมตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 8 วัน (Table 1) ซึ่งมี

ตารางที่ 1. Colony diameter of *Shizophyllum commune* cultivated on SPBDA in dark condition at 25 °C for 8 days.

Sample	Polysaccharide content (μg/g dry cell)
P1	238.96 ±1.3 [a]
P2	167.06 ±1.6 [b]
P3	261.81 ±2.0 [c]
S1	293.30 ±0.4 [d]
S2	302.02 ±0.3 [e]
S3	179.59 ±0.3 [f]
Y1	164.92 ±0.2 [g]
Y2	236.50 ±0.8 [h]
Y3	261.08 ±0.5 [c]

Remark: The same superscripts are not statistically different at $p \leq 0.05$ according to Least Significant Difference test. + = Sparse mycelia ++ = Moderate mycelia +++ = Abundance mycelia.

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*≤0.05) เส้นใยมีลักษณะฟูและหนาแน่นที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ ดังนั้นเมื่อนำเส้นใยของเชื้อเห็ดแครงดังกล่าวไปเพาะเลี้ยง หรือขยายพันธุ์เพิ่มจำนวน จึงมีโอกาสที่จะเจริญได้ดีกว่า เช่นเดียวกัน[8]

3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลิแซคคาไรด์จากตัวอย่างชีวมวลเห็ดแครง 9 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเอสพีบีดี พบว่าเชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 ให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ในช่วง 261.08 - 302.02 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง(Table 2) จากการทดลอง พบว่าปริมาณโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากชีวมวลเห็ดแครงมีปริมจณที่ใกล้เคียงกับโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดสมุนไพร ได้แก่เห็ดนางฟ้า เห็ดหูหนูสีน้ำตาล เห็ดนางรมอังการี และเห็ดเป๋าฮื้อ ที่ศึกษาวิจัยโดย สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ [15] พบว่าเห็ดสมุนไพรดังกล่าว มีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์อยู่ในช่วง 194-325 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นจึงเลือกเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 ซึ่งเป็นเห็ดแครงที่มีอัตราการ

ตารางที่ 2 Polysaccharide content of *Shizophyllum commune* cultivated on SPBD in dark condition at 25 °C for 12 days.

Sample	Colony Diameter (cm.)	Density of mycelia
P1	6.0± 0.3 [a]	+
P2	8.5± 0.4 [b]	++
P3	8.8 ± 0.3 [c]	++
S1	9.0± 0.0 [c]	+++
S2	9.0± 0.0 [c]	+++
S3	8.9± 0.2 [c]	+++
Y1	8.5± 0.3 [b]	++
Y2	9.0± 0.0 [c]	++
Y3	9.0± 0.0 [c]	+++

Remark: The same superscripts are not statistically different at $p \leq 0.05$ according to Least Significant Difference test.

เจริญสูงสุด และมีปริมาณโพลิแซคคาไรด์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*≤0.05) เมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดแครงไอโซเลตอื่นๆ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

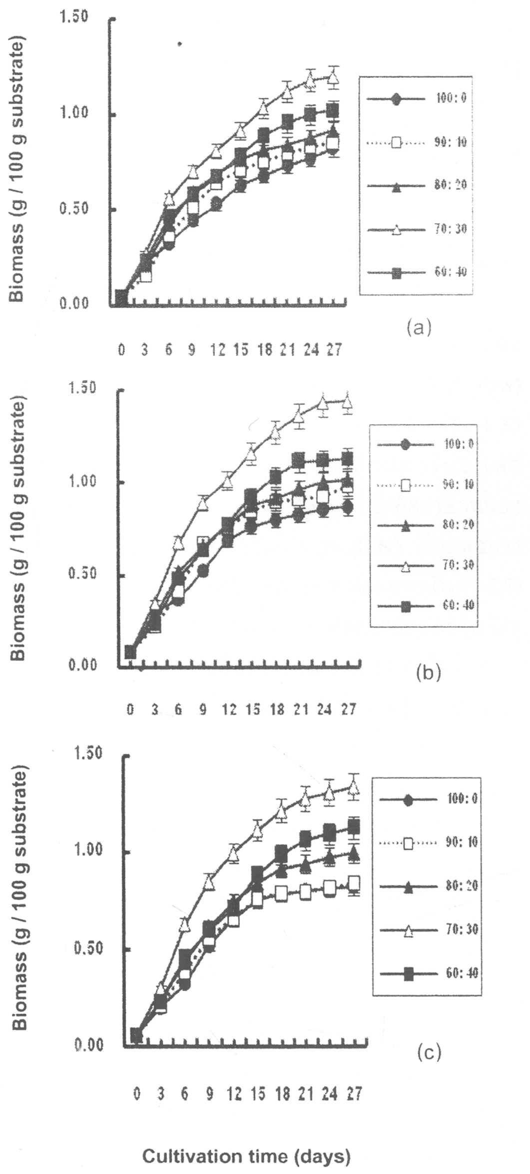
3.3 ผลของอัตราส่วนทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์ม

จากการทดลองศึกษาอัตราส่วนของวัสดุเพาะ ต่อการผลิตชีวมวลเห็ดแครงและดอกเห็ดแครง พบว่าอัตราส่วนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน 70:30 มีประสิทธิภาพต่อการเจริญและสร้างเส้นใยเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 สูงสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ (Figure 1 a-c) ผลผลิตเซลล์ของเชื้อ S1 S2 และY3 เท่ากับ 1.34 1.44 และ1.19 กรัมต่อ100 กรัมวัสดุเพาะ ตามลำดับ และเส้นใยเห็ดทั้ง 3 ไอโซเลต มีลักษณะการเจริญที่ไม่หนาแน่น และเจริญไม่ทั่ววัสดุ เพาะ เส้นใยมีอัตราการเจริญคงที่ หลังจากที่เพาะเลี้ยงได้ 18 วัน โดยที่เส้นใยจะเริ่มเน่าหลังจากการเพาะเลี้ยง

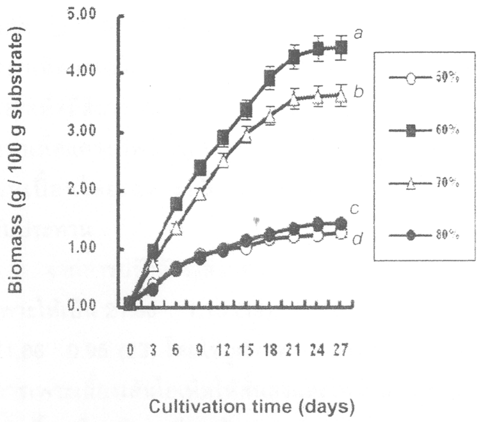
เป็นเวลา 27 วัน เนื่องจากความชื้นเริ่มต้นที่เลือกใช้ในการทดลองร้อยละ 80 มีความชื้นสูงเกินไปทำให้มีการระบายอากาศในวัสดุเพาะไม่ดี จนทำให้เกิดการขาดออกซิเจน ส่งผลให้เส้นใยฝ่อ และเน่าตาย [16] เส้นใยไม่สามารถเจริญจนสร้างดอกเห็ด ดังนั้นจึงไม่สามารถคำนวณค่า BE ได้ เมื่อวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติ พบว่าเชื้อ S1, S2 และ Y3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*≥0.05) โดยที่เชื้อ S2 ให้ผลผลิตเซลล์สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของวัสดุเพาะทะลายปาล์มต่อทางใบปาล์มร้อยละ 70:30 และเชื้อเห็ดแครง S2 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการทดลองข้อ 3.1 และ 3.2 ที่เชื้อ S2 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดเช่นเดียวกัน

3.4 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิต ชีวมวลและดอกเห็ดแครง

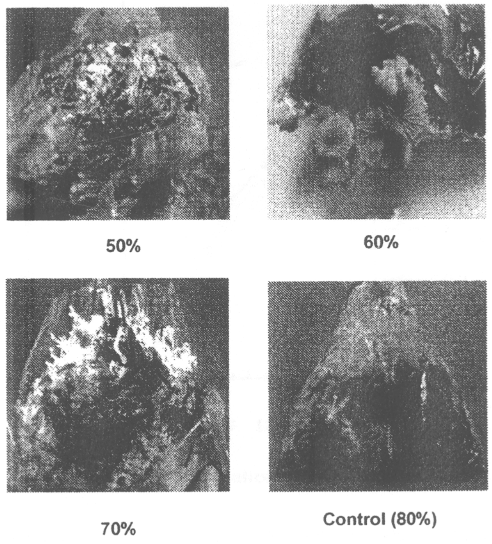
เห็ดแครง S2 เจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยง บนวัสดุเพาะที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*≤0.05) เมื่อเทียบกับที่ระดับความชื้นอื่นๆ โดยให้ผลผลิตเซลล์ 4.45 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ มีค่า BE เท่ากับร้อยละ 7.43 (Figure 2) เส้นใยมีลักษณะการเจริญได้ทั่ววัสดุเพาะ แต่ลักษณะเส้นใยไม่หนาแน่น และสามารถเปิดดอกได้ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 28 วัน การเก็บ



รูปที่ 1. Biomass of *Shizophyllum commune* S1 (a), S2 (b) and Y3 (c) cultivated on mixture of different substrate ratio (empty fruit bunches: oil palm frond)



รูปที่ 2 Biomass of *Shizophyllum commune* (S2) on different initial moisture content. The same superscripts are not statistically different at $p \leq 0.05$ according to LSD test. Values are mean ± SD, n=3.



รูปที่ 3 Fruiting body and mycelia of *Shizophyllum commune* (S2) cultivated on different initial moisture content of mixture substrate ratio 70:30.

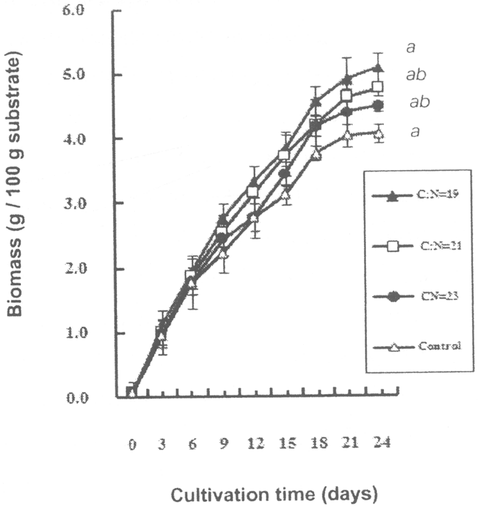
ดอกเห็ดทำได้ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 35 วัน ลักษณะดอกเห็ดมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อย ดอกเห็ดมีสีขาวนวล ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (Figure 3) ส่วนที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะร้อยละ 50, 70 และ 80 พบว่า เส้นใยเห็ดแครงไม่สามารถเจริญจนพัฒนาต่อไปเป็นดอกได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถคำนวณหาค่า BE เนื่องจากความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะร้อยละ 50 เป็นความชื้นที่ต่ำเกินไปทำให้สารอาหารไม่ละลาย เชื้อเห็ดไม่สามารถดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ส่วนที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะร้อยละ 70 และ 80 เป็นช่วงความชื้นที่สูงเกินไปไม่เหมาะสมต่อ

การเจริญของเส้นใยเห็ด ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในหัวข้อก่อนหน้านี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shen และคณะ [17] ที่ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของวัสดุเพาะต่อการเจริญของเห็ดหอม (Shiitake) พบว่าเห็ดหอมมีค่า BE สูงสุดเมื่อวัสดุเพาะมีความชื้นเริ่มต้นอยู่ในช่วงร้อยละ 55-60

3.5 ผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตชีวมวลและดอกเห็ดแครง

ปริมาณอินทรีย์คาร์บอนของทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันมีค่า เท่ากับ 22.12 และ 21.28 (% w/w) ตามลำดับ ส่วนปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 0.79 และ 1.33 (% w/w) ตามลำดับ และมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เท่ากับ 28:1 และ 16:1 ซึ่งอัตราส่วนของสารอาหารในรูปคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N) มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างดอกเห็ด นอกจากนั้นค่า C/N ยังเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความยากง่ายต่อการย่อยสลายวัสดุเพาะเห็ด หากวัสดุเพาะมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง ๆ จะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ยาก[18] เมื่อปรับอัตราส่วน C/N ของวัสดุเพาะ (ทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน,70:30) ด้วยยูเรียให้เป็น 21.86:1.15 (19), 21.86:1.04 (21) และ 21.86:0.95 (23) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 พบว่าเชื้อเห็ดแครง สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่มีปรับอัตราส่วน C/N เท่ากับ 21.86:1.15 (19) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ไม่มีการปรับอัตราส่วน C/N (ชุดควบคุม) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับเชื้อเห็ดแครงซึ่งเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ปรับอัตราส่วน C/N เท่ากับ 21.86:1.04 (21) และ 21.86:0.95 (23) โดยให้ผลผลิตเซลล์เท่ากับ 5.08 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ที่เวลาการเพาะเลี้ยง 24 วัน (Figure 4) เส้นใยเจริญได้ทั่ววัสดุเพาะ ที่เวลาเพาะเลี้ยง 21 วัน เส้นใยเจริญทั่ววัสดุเพาะและเกิดตุ่มดอกเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 วัน เริ่มสร้างดอกเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 29 วัน และสามารถเก็บดอกเห็ดได้ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 33 วัน จำนวนดอกเห็ดมีมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งให้ค่า BE สูงสุดร้อยละ 8.96 น้ำหนักดอกเห็ดสดเฉลี่ย 1.35 กรัมต่อ 100 วัสดุเพาะ (Table 3) ดอกเห็ดมีสีขาวนวล ไม่มีการปนเปื้อนจากวัสดุอื่นๆ ซึ่งต่างจากเห็ดแครงที่พบในแหล่งธรรมชาติโดยทั่วไป ที่มักมีการปนเปื้อนโดยเฉพาะบริเวณครีบดอก ทำให้มีสีที่ไม่น่ารับประทาน

จากการปรับอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของวัสดุเพาะให้เป็น 21.86 : 1.15 (19), 21.86 : 1.04 (21) และ 21.86 : 0.95 (23) โดยใช้ยูเรีย พบว่าสามารถช่วยลดระยะการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดให้สั้นลงและให้จำนวนดอกเห็ดที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 5) ทั้งนี้เนื่องจากยูเรียมีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้สูงและเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต ส่งผลให้เซลล์สามารถดูดซึมเอาโมเลกุลของยูเรียไปใช้ได้โดยตรง [19] จึงทำให้เส้นใยเห็ดสามารถเจริญเติบโต และการสร้างดอกเห็ดได้เร็ว

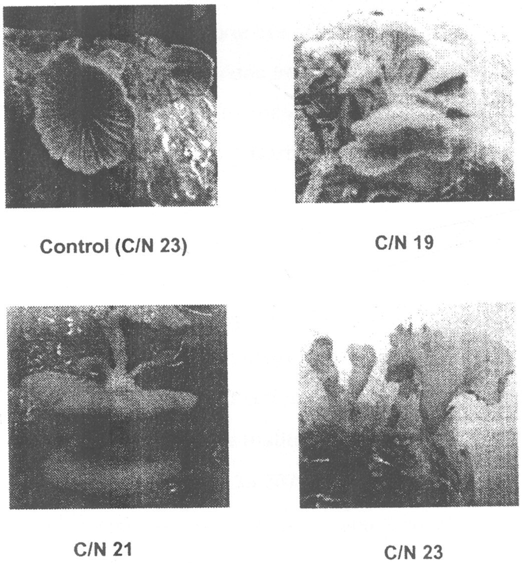


รูปที่ 4 Biomass of *Shizophyllum commune* (S2) on different C/N ratio. The same superscripts are not statistically different at $p \leq 0.05$ according to LSD test. Values are mean ± SD, n=3.

ตารางที่ 3. Time periods of the different C/N ratio of *schizophyllum commune* (S2) cultivation.

C/N	Spawn running (days)	Pin head formation (days)	Fruiting body formation (days)	Average fresh weight (g)	BE%
Control	23	26	31	1.13$\pm$0.1 [a]	7.52$\pm$0.3 [a]
19	21	24	29	1.35 $\pm$0.0 [bc]	8.96$\pm$0.3 [bc]
21	21	24	29	1.23$\pm$0.1 [cba]	8.27$\pm$0.5 [cba]
23	22	24	29	1.22$\pm$0.0 [cba]	8.09 $\pm$0.3 [cba]

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cruz และคณะ [16] พบว่าปริมาณค่าเฉลี่ยของ C/N ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างดอกเห็ดอยู่ในช่วง 16-24 ดังนั้นวัสดุ เหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมันสามารถประยุกต์ใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ดแครงชนิดใหม่ได้ และยังสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิต รวมทั้งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งอีกทางหนึ่งด้วย



รูปที่ 5. Fruiting body of *Shizophyllum commune* (S2) cultivated on different C/N ratio (mixture substrate ratio = 70:30, initial moisture content =60%)

4. สรุปและเสนอแนะ

เชื้อเห็ดแครง S1, S2 และ Y3 มีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอสพีบีดี โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากันคือ 9.0 เซนติเมตร และให้ปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ในช่วง 261.08 - 302.02 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากเห็ดแครงทั้งหมด 9 ไอโซเลต ที่แยกจากตัวอย่างเห็ดแครงที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัด พัทลุง สงขลา และยะลา หลังจากที่เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงทั้ง 3 ไอโซเลต บนวัสดุเพาะทะลายปาล์มเปล่าต่อทางใบปาล์มน้ำมัน (70:30) อัตราส่วนของ C/N เท่ากับ 21.86:0.94 (23.26) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และปรับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน โดยใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ได้เท่ากับ 21.86 : 1.15 (19)พบว่าเชื้อเห็ดแครง S2 ให้ค่า BE ร้อยละ 8.96 น้ำหนักเฉลี่ยดอกเห็ดสด 1.35 กรัมต่อ 100 กรัมวัสดุเพาะ ใช้เวลาการเพาะเลี้ยง 33 วัน ดอกเห็ดมีสีขาวนวล ไม่ปนเปื้อนจากวัสดุอื่นๆ ผลจากงานวิจัยจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้วัสดุเหลือทิ้งทะลายปาล์มเปล่าและทางใบปาล์มน้ำมัน เป็นวัสดุทางเลือกเพื่อการเพาะเห็ดแครง ซึ่งเป็นวิธีการจัดการสิ่งแวดล้อม ด้วยการลดปริมาณและการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง

กิติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานวิจัยและพัฒนา ที่สนับสนุนทุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ประเภทพัฒนานักวิจัย ปีงบประมาณ 2552 ในการทำวิจัยครั้งนี้

5. บรรณานุกรม

[1] นิคม แหลมสัก. 2551. "ประโยชน์จากเศษเหลือชีวมวลปาล์มน้ำมัน". **ประชาคมวิจัย**.14(82):30.

[2] Sanchez, C. 2009. "Lignocellulosic residues Biodegradation and bioconversion by fungi". **Biotechnology Advances**. 27:185-194.

[3] อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2541. "เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก". **ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด**.13 (3):8-11.

[4] Adejoy, O. D., Tayo, B. C., Ojunjobi, A. A., and O. O. Afolabi. 2007. "Physicochemical studies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian edible fungus". **World Applied Sciences Journal.** 2 (1):73-76.

[5] Xujie, H., and Wei, C. 2008. "Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology" **Carbohydrate Polymers**. 72:67–74.

[6] Huang, H. C., and Liu, Y. S. 2008. "Enhancement of polysaccharide production by optimization of culture conditions in shake flask submerged cultivation of *Grifola umbellata*". **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**. 39:307–311.

[7] Kumari, M., Survase, S, A., and Singhal, R, S. 2008. "Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM". **Bioresource Technology.** 99:1036–1043.

[8] นิภาพร อามัสสา และ นิวัติ เสนาะเมือง. 2548. "ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ". **วารสารวิจัย ม.ข**. 10(4):311-321.

[9] Suwanno, S., Nakamura, K., Amano, Y., Shida, Y. and M. Horiuchi. 2005. "Development of the method for efficient disruption and rapid extraction on the β-l-3 glucan determination from the mycelium of *Ganoderma lucidum*". **Mushroom Science and Biotechnology**. 13(2):83-93.

[10] 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 (3):350-356.

[11] Wetzel, R, G., and Manny, B.A. 1972. "Decomposition of dissolved organic carbon and nitrogen compounds from Leaves in an experimental hard-water stream". **Limnology and Oceanography**.17:229-279.

[12] Philippoussis, A., Zervakis, G., and Diamantopoulou, P. 2001. "Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvarella volvacea* and *Pleurotus* spp." **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 17:191-200.

[13] Mandeel, Q. A., Al-Laith, A. A. and S. A. Mohamed. 2005. "Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes". **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. :601-607.

[14] Cruz, O. S., Castan, G. S., Hach, J., Rojas, L. M. G. and E. F. Torres. 1999. "Effect of substrate composition on the mycelia growth of *Pleurotus ostreatus* an analysis by mixture and response surface methodologies". **Process Biochemistry**. 35:127-133.

[15] สุวิทย์ สุวรรณโณ และศิริวรรณ มากสุวรรณ. 2553. "การผลิตน้ำเห็ดสมุนไพรสกัดพร้อมดื่ม". **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**. 20(2):278-288.

[16] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[17] Shen, Q., Liu, P., Wang, X. and Royse, D. J.2008. "Effects of substrate moisture content, log weight and filter porosityon shiitake (*Lentinula edodes*) yield". **Bioresource Technology**. 99: 8212-8216.

[18] Wu, J. z., Cheung, P. C. K., and Huang, N. I. 2004. "Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fiber". **Food Chemistry**. 85:101-105.

[19] ยงยุทธ โอสถสภา. 2552. **ธาตุอาหารพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.