การพิสูจน์เอกลักษณ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บรักษาหัวเชื้อ และการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์

ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
กรกฎาคม 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพิสูจน์เอกลักษณ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บรักษาหัวเชื้อ และการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์"

ของ นายณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณฤทธิ์ ฤทธิรณ)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โอรส รักชาติ)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา)

อนุมัติ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

19 กค 2562

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุตส่าห์สละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ร่วมกับบริษัท ถั่งเฉ้าทองคำ จำกัด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทางสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และคุณอุนารินทร์ กิจไพบูลทวี กรรมการผู้จัดการ บริษัท ถั่งเฉ้าทองคำ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรทุกท่านที่ได้ประสิทธ์ประสาทความรู้และประสบการณ์ตลอดระยะเวลาการศึกษา และท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณสมาชิกสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและแนะนำการใช้เครื่องมือที่จำเป็นต่อการวิจัยในครั้งนี้

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณครอบครัวข้าพเจ้า ประกอบด้วย บิดา มารดา พี่สาว น้องสาว รวมถึงภรรยาและลูกสาวของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุน ในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อไป

ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา

ชื่อเรื่อง	การพิสูจน์เอกลักษณ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บรักษาหัวเชื้อ และการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์
ผู้วิจัย	ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ ปร.ด. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2561
คำสำคัญ	เห็ดถั่งเช่าสีทอง อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน อาหารสังเคราะห์ เทคนิคอาร์เอพีดี อายุการเก็บรักษา เทคนิค NIRS

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ 5 ประการ คือ 1) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรากลุ่มนี้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD 2) เพื่อศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว 3) เพื่อศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งหลังการเก็บเกี่ยวต่อการเปลี่ยนแปลงด้านคุณภาพ 4) เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่แตกต่างกันต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์ 5) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) ซึ่งผลการทดลองของแต่ละวัตถุประสงค์มีดังนี้

จากการศึกษา พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM3 ให้ผลผลิตสูงสุดโดยมีจำนวนดอกเฉลี่ย 49.50 ดอก และมีน้ำหนักสดเฉลี่ย 22.84 กรัม ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 กรัม ส่วนสายพันธุ์ CM6 ไม่มีการเจริญเป็นดอกเห็ด ดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้สีในลักษณะเดียวกัน ดอกเห็ดของสายพันธ์ CM5 มีค่าความแน่นเนื้อสูงสุด คือ 0.38 นิวตัน อย่างไรก็ตามลักษณะรูปร่างของดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีทั้งลักษณะผอมยาว ทรงกระบอง ปลายมน และอ้วนสั้นปลายแหลม ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM3 มีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงที่สุดเฉลี่ย 561.92 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่สายพันธุ์ CM2 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดเฉลี่ย 1,414.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

จำนวน 25 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 24 ไพรเมอร์ ที่ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน รวมทั้งสิ้น 352 loci เมื่อทำการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.163-0.830 โดยสายพันธุ์ CM5 และ CM6 มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วน CM2 และ CM3 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด

จากการศึกษาส่วนประกอบของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า สูตรอาหาร M10 ที่ประกอบด้วย ข้าวสาร 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม ไข่ไก่ดิบ 10 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) 40 มิลลิลิตร เป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมมากที่สุดเมื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยให้ผลผลิตจำนวนดอกเฉลี่ย 101 ดอกต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 กรัม ให้น้ำหนักรวมเฉลี่ย 40.98 กรัม ให้ลักษณะของดอกเห็ดที่ยาวและอวบกว่าสูตรอาหารอื่นๆ ดอกเห็ดมีค่าความสว่าง (L*), ค่าสีเหลือง (b*) และค่าสีแดง (a*) เฉลี่ยเท่ากับ 37.43, 22.03 และ 50.6 ตามลำดับ มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ย 0.39 นิวตัน ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) มีค่าเฉลี่ย 13.16% มีปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ย 1,166.59 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 4,799.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ต่อมาเมื่อทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว พบว่า น้ำหนักสดของดอก ความยาวก้านดอก ค่า TSS ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ของดอกเห็ดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 7 ถึงสัปดาห์ที่ 9 ในขณะที่ค่าความสว่าง (L*) มีค่าลงลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน พบว่า มีค่าเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 7 หลังจากนั้นปริมาณสารทั้งสองเริ่มลดลง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในช่วงสัปดาห์ที่ 7 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงมีความเหมาะสมที่สุดในการเก็บผลผลิต

จากการศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ กล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยล์แบบซิปล็อค ถุงพลาสติกชนิด PA/LDPE (polyamide/low density polyethylene) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 สภาวะ คือ 5°C และ 30°C ในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่มีผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เพื่อประเมินผลทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือน กำหนดให้ตัวอย่างเห็ดที่ไม่ได้ถูกบรรจุลงใน บรรจุภัณฑ์ใดๆ วางไว้ที่อุณหภูมิในทั้งสองสภาวะเป็นตัวเปรียบเทียบ (5°C = control 1, 30 °C = control 2) พบว่า การเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 5°C ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของดอกเห็ดน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน ในขณะที่

การเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวที่อุณหภูมิ 30°C ทำให้การดูดกลับความชื้น ค่า water activity (a_w) และกิจกรรมของเอนไซม์ SOD และเอนไซม์ CAT เกิดการเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อ ค่า TSS ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน พบว่า ให้ผลการเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างเห็ดที่ไม่ได้ถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C (control 2) มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในทุกด้านมากที่สุด เมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน

จากการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเส้นใยของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองในเทคนิคที่แตกต่างกัน 8 วิธี ได้แก่ 1) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% 2) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% 3) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C 4) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C 5) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C 6) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 7) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2 และ 8) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ช่วงการทดสอบ คือ เดือนที่ 4, 8 และ 12 วิเคราะห์และประเมินผลในด้านต่างๆ ได้แก่ การรอดชีวิตของเชื้อ (viability) ความบริสุทธิ์ของเชื้อ (purity) และการคงสภาพของเชื้อ (stability) ทำการเปรียบเทียบผลการประเมินในด้านต่างๆ กับเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) พบว่า เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้และปราศจากการปนเปื้อน 100% ในทุกวิธีของการเก็บรักษา ส่วนโคโลนีของเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA ให้ผลในลักษณะเดียวกันในทุกช่วงของการทดสอบ โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) สำหรับความคงสภาพของเชื้อ พบว่า การเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 10% และวิธีเก็บรักษาในเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C หรือ 45°C ให้ผลผลิตที่เป็นจำนวนดอก น้ำหนักสด ค่าความแน่นเนื้อ ค่าสี ค่า TSS และปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ในทั้ง 3 ช่วงของการทดสอบ ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการ

ต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีขนาดโคโลนี จำนวนดอก น้ำหนักสด ค่าความแน่นเนื้อ ค่าสี ค่า TSS และปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินต่ำกว่าสภาวะอื่นๆ ในทั้ง 3 ช่วงของการทดสอบ

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) มาทำนายหาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ ดอกสด ดอกสดสับละเอียด ดอกแห้งที่บดเป็นผง และสารสกัดในกระดาษกรองที่ผ่านการอบแห้ง ทำการออกแบบจำลองเพื่อสร้างสมการและทดสอบสมการด้วยเทคนิค Partial Least Squares Regression (PLSR) ที่มีการปรับแต่งสเปกตรัม 2 วิธี คือ constant offset elimination (COE) และ vector normalization (SNV) พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) ในตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สับละเอียด โดยให้ค่า coefficient of determination of prediction (R^2_p) เท่ากับ 0.95 ค่า root mean square error of prediction (RMSEP) เท่ากับ 26.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า standard error of prediction (SEP) เท่ากับ 27.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ -8.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า residual predictive deviation (RPD) เท่ากับ 5.04 ส่วนแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการ COE ในตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สับละเอียด โดยให้ค่า R^2_p เท่ากับ 0.98 ค่า RMSEP เท่ากับ 277.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า SEP เท่ากับ 283.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -1.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า RPD เท่ากับ 8.9 เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสมการ ได้แก่ ค่า bias ค่า SEP และค่าความชัน (slope) ของทั้งสองสมการดังกล่าว ตามมาตรฐาน ISO12099 พบว่า มีค่ายอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Title	IDENTIFICATION CULTIVATION PRESERVATION AND STORAGE OF *CORDYCEPS MILITARIS* (L.) LINK IN COMMERCIAL SCALE
Author	Natthapong Singpoonga
Advisor	Assistant Professor Peerasak Chaiprasart, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Boonsong Saeng-on, Ph.D.
Academic Paper	Thesis Ph.D. in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, 2018
Keywords	*Cordyceps militaris*, adenosine, cordycepin, artificial culture, RAPD technique, NIRS technique

ABSTRACT

The objectives of this research were to 1) compare the differences among six medicinal fungus *Cordyceps militaris* strains collected from various commercial mushroom cultivation farms in Thailand in yield production, the physico-chemical properties of fruiting bodies, concentrations of individual bioactive compounds, and DNA fingerprinting pattern of these fungal strain with RAPD technique; 2) study the suitable composition of rice culture media for *C. militaris* cultivation and the appropriate harvesting time; 3) study the effect of storage conditions to maintain and potentially enhance the physico-chemical properties and the content of bioactive compounds in dried fruiting bodies of the mushroom after harvest; 4) study the effect of different preservation methods for mycelia culturing of *C. militaris* to enhance subsequent fruiting body formation and the production of bioactive compounds; and 5) evaluate the ability of near-infrared spectroscopy (NIRS) with partial least squares (PLS) regression method to predict adenosine and cordycepin contents in the fruiting bodies of *C. militaris*.

The results revealed that the CM3 strain had the highest production of fruiting bodies with 49.50 fruiting and fresh weight 22.84 g of fresh weight per 50g of rice medium, while the CM6 was not found the fruiting bodies formation occurred. The physical properties of the fruiting bodies of six commercial strains of *C.militaris* (CM1-CM6) from Thailand were

likely seem to be similar color. The CM5 strain had the highest firmness of fruiting bodies (0.37 N). However, the shape of the fruiting bodies were difference including with cylinder shape, long stipe, and round cap in some strains, while others had a plump shape, short stipe, and sharp tip. The highest adenosine contents were found in the CM3 isolate (561.92 mg kg^{-1}), while the highest cordycepin contents occurred in CM2 (1,414.08 mg kg^{-1}). Twenty-five universal primers were used to evaluate the genetic diversity among the six commercial strains of *C. militaris* using the random-amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. Of these RAPD markers, 24 primers were identified as being suitable for analyzing the genetic diversity amongst the isolates with RAPD polymorphic bands identified a total of 352 loci. The banding scores were used to develop a phylogenetic tree. This indicated that all strains had similarity coefficient ranging from 0.163-0.830, with the highest genetic similarity of CM5 and CM6 strains but the highest genetic difference found in CM2 and CM3 strains.

The culture medium M10 (rice: silkworm: fresh egg: PDB, 50:30:10:40, g/g/mL/mL) was found to be the most suitable culture medium for the mushroom cultivation. This medium produced the highest number of fruiting bodies (101 fruit bodies per 50 g of rice medium) and the highest fresh weight of fruiting bodies (40.98 g per 50 g of rice medium). The fruiting bodies on the M10 medium were thicker and longer than fruiting bodies produced on other media. The color of this fruiting bodies, expressed as L*, a* and b* values, were 37.4, 22.0 and 50.6, respectively. Firmness and total soluble solids concentration (TSS) were 0.39 N and 13.16%, respectively. Adenosine and cordycepin concentration obtained were 1,166.59 and 4,799.32 mg kg^{-1}, respectively. The study of appropriate harvesting time of *C. militaris* that cultivated on the M10 medium was further investigated. It was found that the fresh weight, length, TSS of fruiting body, redness (a* value) and yellowness (b* value) were significantly increased as the culture period increased and was stable from 7^{th} week to 9^{th} week while the lightness (L* value) of fruiting bodies decreased as the culture period increased. Adenosine and cordycepin contents significantly increased from 1^{st} week to 7^{th} week of the cultivation. The results indicated that *C. militaris*

cultivation on rice culture medium (M10) for 7-8 weeks was a suitable medium for cultivation.

The long-term storage of dried *Cordyceps militaris* fruiting bodies under different types of packaging [i.e., sealed plastic box, foil pouch, and sealed plastic bag (co-polymer of polyamide (PA) with low density polyethylene (LDPE) under vacuum)] at 5°C and 30°C was investigated. Dried fruiting bodies were stored at 5°C or at 30°C without packaging as the controls at 5°C and 30°C. It was found that, the dried mushroom stored in sealed plastic box held at 5°C, foil bag held at 5°C, and sealed plastic bag PA/LDPE under vacuum held at 5°C had the lowest change in color ($p \leq 0.05$) after 12 months of storage, while the samples stored in these three packaging type at 30°C had the lowest change in the percentage of moisture absorption, a_w, SOD and CAT activity ($p \leq 0.05$). The samples stored in sealed plastic box, foil bag, and plastic bag PA/LDPE under vacuum at 5°C and 30°C were similar values and no statistical difference ($p \geq 0.05$) in firmness, TSS, adenosine and cordycepin concentration after 12 months of storage, whereas samples stored at 30°C and those without packaging were unacceptable for overall quality.

Preservation of *C. militaris* mycelia cultures under eight different methods were investigated including, freezing at -80°C, chilling at 5°C in 10% (v/v) glycerol, chilling at 5°C on rice grains that were dried at 35°C, 45°C or 55°C, and three subcultures method with holding at 5°C. The cultivation of the original strain before the preservation was used as a control. The viability, purity and stability of the mycelia were evaluated every 4 months until 12 months. It was found that all preservation methods maintained the viability and purity of the cultures. The cultures frozen at -80°C, chilled at 5°C in 10% (v/v) glycerol had the highest sizes of colony diameters but there were not different size to the control ($p \geq 0.05$). For stability, the cultures frozen at -80°C, chilled at 5°C in 10% (v/v) glycerol, or kept on rice grains dried at 35°C or 45°C had similar numbers of fruiting bodies, fresh weight, firmness, color, TSS, adenosine and cordycepin concentration to the control ($p \geq 0.05$) at 4, 8 or 12 months of storage. Culture preserved in the third subcultures at 5°C showed negatively affected sizes of colony diameters, numbers of fruiting bodies, fresh weight, firmness, color, TSS, adenosine and cordycepin production at 4, 8 or 12 months of storage.

The feasibility of near-infrared spectroscopy (NIRS) to determine the adenosine and cordycepin concentration in the fruiting body of *Cordyceps militaris* was investigated. Four forms of fruiting body were used in this study: fresh fruiting bodies, chopped fresh fruiting bodies, dried powder fruiting bodies, and dry extract system for infrared. The regression models were developed using partial least squares (PLS) regressions with two preprocess methods, namely constant offset elimination (COE) and vector normalization (SNV), which overcame the baseline problems. It was found that the optimum model for determining adenosine concentration was obtained from non-preprocessing spectra, when used on chopped fresh fruiting bodies. The coefficient of determination of prediction (R^2), root mean square error of prediction (RMSEP), standard error of prediction (SEP), bias and residual predictive deviation (RPD) values were 0.95, 26.90 mg kg^{-1}, 27.50 mg kg^{-1}, -8.57 mg kg^{-1} and 5.04, respectively. For cordycepin concentration, the optimum model of prediction was obtained from a constant offset elimination spectrum, when used on chopped fresh fruiting bodies which provided R^2, RMSEP, SEP, bias and RPD values of 0.98, 277.0 mg kg^{-1}, 283.69 mg kg^{-1}, -1.05 mg $kg^{-1}$and 8.9, respectively. The accuracy and performance of equation was determined by ISO12099; bias value, standard error of prediction (SEP) value and slope values were considered. It was found that these two equations can be considered to be acceptable at the probability level of 95% confidence.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	6
	ขอบเขตของงานวิจัย	6
	ข้อตกลงเบื้องต้น	8
	นิยามศัพท์เฉพาะ	8
	สมมติฐานของการวิจัย	9
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	10
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดถั่งเช่า	10
	การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองหลังการเก็บเกี่ยว	48
	การตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	57
	เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRs)	62
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	84
	การทดลองที่ 1 ตอนที่ 1 การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่า สีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	84
	การทดลองที่ 1 ตอนที่ 2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD	88
	การทดลองที่ 2 ตอนที่ 1 ศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง	92

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	การทดลองที่ 2 ตอนที่ 2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร	96
	การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ	97
	การทดลองที่ 4 การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์	102
	การทดลองที่ 5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS)	106
4	ผลการวิจัย	113
	ผลการทดลองที่ 1 ตอนที่ 1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย จำนวน 6 แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	113
	ผลการทดลองที่ 1 ตอนที่ 2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์ จากฟาร์มเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย จำนวน 6 แหล่ง ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD	118
	ผลการทดลองที่ 2 ตอนที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อการเจริญเติบโต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง	127
	ผลการทดลองที่ 2 ตอนที่ 2 ผลการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10	139

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ผลการทดลองที่ 3 ผลการศึกษาอิทธิพลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ..... 145

ผลการทดลองที่ 4 การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์ด้านผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 175

ผลการทดลองที่ 5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS)..... 200

5 บทสรุป..... 232

สรุปผลการวิจัย..... 232

อภิปรายผล..... 233

ข้อเสนอแนะ..... 255

บรรณานุกรม..... 256

ภาคผนวก..... 272

ประวัติผู้วิจัย..... 292

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางด้านเภสัชวิทยาในเห็ดถั่งเช่า..... 26
2 อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจนและไอน้ำสำหรับฟิล์มหลายชั้นที่นิยมใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง..... 56
3 อัตราการซึมผ่านของไอเอทานอลสำหรับฟิล์มพลาสติกบางชนิด..... 57
4 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด..... 65
5 ขอบเขตการประเมินผลค่า SEP เมื่อเทียบกับค่า SEL..... 68
6 การเลือกตัวอย่างและจัดกลุ่มตัวอย่างตามค่าทางเคมีแบบสลับหนึ่งต่อหนึ่ง..... 72
7 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า RPD..... 77
8 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า R..... 78
9 การคำนวณค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (Bias) ของสมการแคลิเบรชั่น..... 79
10 รหัสและแหล่งที่รวบรวมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆ..... 84
11 ข้อมูล universal primer ที่ใช้ในการทดลอง..... 91
12 ส่วนประกอบ (components) ของวัตถุดิบในแต่ละสูตรอาหาร (formula)..... 94
13 วิธีการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาวะที่แตกต่างกัน..... 99
14 ปริมาณดอก (number of stroma) และน้ำหนักสด (fresh weight) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน.... 114
15 ขนาดของดอกเห็ด (size of fruiting bodies) ความแน่นเนื้อของดอก (firmness) สี (color) ของดอก และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์..... 117
16 จำนวนแถบ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดย universal primer จำนวน 25 ไพรเมอร์..... 119

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

17 ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์..... 126

18 ระยะเวลาในการเจริญของเส้นใย (mycelium growth) และการเกิดตุ่มดอก (primordial formation) เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน..... 128

19 ผลผลิตของจำนวนดอก (total of stroma) น้ำหนักสด (fresh weight) และจำนวนเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแต่ละสูตรอาหารที่มีขนาดความยาว (length) และเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) ที่แตกต่างกัน..... 132

20 อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ค่าสี (color) และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 136

21 อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 137

22 องค์ประกอบทางเคมีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M10..... 138

23 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงการดูดกลับความชื้น (moisture absorption)..... 146

24 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w)..... 149

25 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณความแน่นเนื้อ (firmness)..... 152

26 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงสีค่าความสว่าง (L*) และค่าสีแดง (a*)..... 160

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

27 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสีเหลือง (b*) และ Hue angle (H°)..... 161

28 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS)..... 164

29 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin)..... 168

30 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD activity) และเอนไซม์ catalase (CAT activity)..... 174

31 การรอดชีวิต (viability) และความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4 8 และ 12 เดือน..... 178

32 การคงสภาพ (stability) ด้านผลผลิตดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน..... 183

33 การคงสภาพ (stability) ความแน่นเนื้อ (firmness) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (Total soluble solid; TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน..... 190

34 การคงสภาพ (stability) ค่าสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน..... 195

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

35 การคงสภาพ (stability) ปริมาณอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน..... 199

36 ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่วัดด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC โดยกำหนดให้ใช้เพื่อการสร้างสมการ (calibration set) จำนวน 20 ตัวอย่าง และใช้เพื่อการทดสอบสมการ (validation set) จำนวน 19 ตัวอย่าง..... 201

37 พันธะชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งของเลขคลื่นที่ดูดซับแสงในย่าน NIR..... 203

38 ผลการทดสอบแบบจำลองในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ..... 225

39 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC และผลการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนโดยวิธี NIR ด้วยสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ..... 229

40 การวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC และผลการทำนายปริมาณคอร์ไดเซปินโดยวิธี NIR ด้วยสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ..... 230

41 การทดสอบค่าทางสถิติตามมาตรฐาน ISO12099 ของสมการที่ดีที่สุดในการทำนายสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน..... 231

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ลักษณะของราที่เจริญและงอกออกจากแมลงหรือเจ้าบ้านชนิดต่างๆ..... 10
2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*)..... 13
3 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า..... 19
4 เห็ดถั่งเช่าทิเบต..... 20
5 เห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 23
6 เห็ดถั่งเช่าหิมะ..... 24
7 เห็ดถั่งเช่าจักจั่น..... 25
8 โครงสร้างของสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน..... 58
9 วิถีการสังเคราะห์สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน..... 59
10 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC..... 61
11 การกระทำของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับสารต่างๆ..... 63
12 ลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ..... 64
13 สเปกตรัมผิดปกติ สามารถสังเกตได้ในขณะวัดสเปกตรัม..... 70
14 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 98
15 เครื่อง NIR spectrometer แบบตั้งโต๊ะ รุ่น Matrix-F duplex (Bruker, Germany).... 107
16 รูปแบบการเตรียมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 108
17 ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่เจริญในอาหารข้าว..... 114
18 ขนาดและรูปทรงของดอกเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารข้าว 60 วัน..... 115
19 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จำนวน 6 สายพันธุ์..... 118
20 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, OPA-06, OPA-10, OPA-17, OPB-06, และ OPB-20..... 121
21 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-01, OPC-07, OPC-19, OPC-20 OPD-03 และ OPD-06..... 122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

22 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPD-11, OPE-11, OPE-13, OPF-16, OPF-20 และ OPG-10..... 122

23 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-12, OPH-03, OPJ-14, OPJ-20, OPT-16 และ OPT-19..... 124

24 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ และ OPX-01..... 125

25 แผนภูมิความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์..... 126

26 ความยาวของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 130

27 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 131

28 อิทธิพลของระยะเวลา (culture period) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสด (fresh weight) และความยาว (length) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10..... 140

29 การเจริญเติบโตของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10 ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน..... 141

30 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนค่าความแน่นเนื้อ (firmness) และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10..... 142

31 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนค่าสี (color) ได้แก่ ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10..... 143

32 อิทธิพลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนค่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10..... 144

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

33 อิทธิผลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงการดูดซับความชื้น (moisture absorption)..... 146

34 อิทธิผลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w) ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 148

35 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง.... 151

36 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 154

37 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 155

38 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (b*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 156

39 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฉดสี (Hue angle; H°) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 158

40 ลักษณะสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างเป็นระยะเวลา 12 เดือน..... 159

41 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS)..... 163

42 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีน (adenosine) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 166

43 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง..... 167

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

44 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD activity)..... 171

45 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT activity)..... 173

46 ขนาดโคโลนีของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน..... 179

47 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน..... 184

48 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน..... 185

49 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน..... 186

50 สเปกตรัม (Original spectrum) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 204

51 สเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง (preprocessing spectrum) โดยวิธี constant offset elimination (COE) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 205

52 สเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง (preprocessing spectrum) โดยวิธี vector normalization (SNV) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 206

53 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด..... 209

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

54 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด..... 210

55 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด..... 211

56 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด..... 212

57 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง..... 213

58 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง..... 214

59 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง..... 215

60 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง..... 216

61 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด 217

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

62 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด..... 218

63 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด..... 219

64 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด..... 220

65 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง..... 221

66 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง..... 222

67 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม calibration sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง..... 223

68 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง..... 224

69 Regression coefficient plots..... 228

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris* (L.) Link) เป็นเชื้อราปรสิตของแมลง (Entomofungus) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes (Das et al., 2010, pp. 961-968) เป็นเห็ดถั่งเช่าอีกสายพันธุ์หนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อใช้รักษาสารพัดโรคและบำรุงร่างกายเช่นเดียวกันกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต *(Ophicordyceps sinensis)* หรือชื่อเดิม *(Cordyceps sinensis)* (ธัญญา ทะพิงค์แก, น. 28) ลักษณะเด่นของเห็ดถั่งเช่าสีทอง คือ ดอก หรือ สโตรมา (stroma) เป็นก้านยาวเหมือนกระบองและมีสีเหลืองส้ม จึงเรียกว่า "เห็ดถั่งเช่าสีทอง" (chainese golden grass) เห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถเกิดได้ในแมลงหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่จะเกิดในตัวหนอน และดักแด้ผีเสื้อ (Lepidopteran) พบมากตามที่ราบสูงแถบภูเขาหิมาลัยในประเทศทิเบต เนปาล ภูฐาน อินเดีย และจีน ความสูงระหว่าง 3,500-5,000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล รวมถึงเขตป่าดิบชื้นในหลายประเทศ เช่น เกาหลี ญี่ปุ่น เวียดนาม และไทย เป็นต้น เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาหลายชนิดเช่นเดียวกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต (Shashidhar et al., 2013, pp. 1013-1030) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือ อะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin หรือ 3'-deoxyadenosine) โดยเฉพาะสารคอร์ไดเซปิน ซึ่งพบครั้งแรกในเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Cunningham et al., 1951, pp. 2299-3200) มีรายงานหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติทางยาเทียบเท่ากับเห็ดถั่งเช่าทิเบต และมีอีกหลายฉบับรายงานว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงกว่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต (Huang et al., 2009, pp. 957-961) สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้านและมีคุณสมบัติที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยา เช่น เสริมสมรรถนะทางเพศ ต้านมะเร็งและเนื้องอก ต้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ ช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ป้องกันน้ำตาลในเลือดสูง ลดไขมันในเส้นเลือด บรรเทาอาการโรคเบาหวาน ลดการเหนื่อยล้า ป้องกันเซลล์ประสาท ปองกันการเสื่อมสภาพของตับ ไต และปอด เป็นต้น (Das et al., 2010, pp. 961-968) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) ที่สามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการแก่ก่อนวัยอันควร ป้องกันการเกิดฝ้า กระ ริ้วรอยเหี่ยวย่น และโรคเรื้อรังขึ้น เป็นต้น

(Wang, Gu, & Yuan, 2005, pp. 74-79) ทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองกลายเป็นเห็ดเศรษฐกิจตัวใหม่ที่กำลังมาแทนเห็ดถั่งเช่าทิเบตและมีราคาจำหน่ายสูงใกล้เคียงกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต

เนื่องจากปัจจุบันมีผู้เพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองในทางการค้าเพิ่มมากขึ้นจึงอาจมีการนำสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศมาเป็นแม่เชื้อสำหรับทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งสายพันธุ์ที่เกิดในพื้นที่ที่แตกต่างกันอาจมีความแปรปรวนทางด้านทางพันธุกรรมส่งผลให้ผลผลิตและคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของดอกเห็ดมีความแตกต่างกัน เช่น รูปร่าง ขนาด สี และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น มีการศึกษาเชื้อราสกุลคอร์ไดเซพ (*Cordyceps* (Fr.) Link) ในประเทศไทย พบว่า มีมากถึง 80 ชนิด บริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ (วารุณี บวรรัตโตภาค และคณะ, 2545, น. 21-31) นอกจากนี้ ธัญญา ทะพิงค์แก (2555ก, น. 113-117) รายงานว่าสามารถคัดแยกสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*; CMRU) จากธรรมชาติ ได้จำนวน 15 ชนิด (CMRU1-CMRU15) ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวและบนอาหารแข็งที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสายพันธุ์ CMRU ทั้ง 15 ชนิด ยังมีความแปรปรวนสูงในด้านความสามารถในการผลิตสารคอร์ไดเซปิน (คือประมาณ 2,000-8,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่คัดแยก และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU1-CMRU15 พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านขนาด รูปร่าง สีของดอกเห็ด การเจริญเติบโตของเส้นใย บางสายพันธุ์ไม่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด และบางสายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มในระยะดอกเห็ด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Stensrud et al. (2005, pp. 41-56; Chen et al., 2004, pp. 153-158; Wang et al., 2008, pp. 147-155) รายงานว่าเชื้อรา *C. militaris* ที่พบในพื้นที่ต่างกันอาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม และสามารถผลิตสารคอร์ไดเซปินได้ในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นได้ว่าสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงกันอยู่ทั่วไปนั้นอาจมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) และการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ Inter-simple sequence repeat (ISSR) (Liang et al., 2008, pp. 549-556), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) รวมถึงเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Wen et al., 2012, pp. 5215-5221) เป็นต้น โดยเฉพาะเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพง มีไพรเมอร์ (primer) ให้เลือกใช้จำนวนมาก และใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 74) ดังนั้น

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การให้ปริมาณของผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้รับมาจากฟาร์มเพาะเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง รวมถึงศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรากลุ่มนี้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD เพื่อการใช้ประโยชน์ในระดับเชิงการค้าต่อไป

เห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถเพาะเลี้ยงได้ในแมลงหลายชนิด เช่น ดักแด้ไหม (Hong et al., 2010, pp. 128-132; Luerdara et al., 2015, pp. 95-102) และสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวฟ่าง ข้าวขาว ข้าวกล้อง ถั่ว เมล็ดข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นต้น (Lim et al., 2012, pp. 181-187; Kim et al., 2010, pp. 133-136; Dong et al., 2012, pp. 2030-2036; Gregori, 2014, pp. 45-52; ธัญญา ทะพิงค์แก และคณะ, 2557, น. 27-48; รัฐพล ศรประเสริฐ และคณะ, 2559, น. 239-251) ปัญหาที่ผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองพบเป็นส่วนใหญ่คือ ผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง ในขณะที่ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น สาเหตุสำคัญนอกจากสายพันธุ์แล้วอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญหนึ่งที่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว จากรายงานที่มีการเผยแพร่เรื่องการเพาะเลี้ยงเห็ด พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงบางสูตรยังมีคุณภาพไม่ดีพอ บางสูตรมีการเตรียมวัตถุดิบหลายชนิดและมีขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัย จึงสนใจที่จะศึกษาปรับปรุงสูตรอาหารสังเคราะห์ในเมล็ดธัญพืชข้าวและวัตถุดิบอื่นๆ ที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญเติบโต หาได้ง่ายในท้องถิ่น และมีราคาถูกมาทำการศึกษาทดลองโดยประเมินจากการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิตโดยรวมของดอกเห็ด คุณสมบัติเคมีทางกายภาพของดอกเห็ด และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ

ในการบริโภคเห็ดถั่งเช่าเพื่อเป็นยามีหลายวิธี ตั้งแต่โบราณมานิยมรับประทานสดหรือแห้งก็ได้ แต่โดยธรรมชาติของเห็ดถั่งเช่าเมื่อทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดออกจากอาหารที่เพาะเลี้ยงแล้ว ดอกเห็ดจะเหี่ยวลงอย่างรวดเร็วจึงไม่นิยมเก็บเป็นดอกสดไว้รับประทาน ประกอบกับต้องใช้วิธีการเก็บรักษาดอกสดที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้ต้นทุนสูง ส่วนใหญ่จึงนิยมนำมาทำแห้ง โดยนำมาตากแดดตามธรรมชาติแล้วนำมาต้มรับประทานเป็นยาในรูปของชาถั่งเช่า หรือบดเป็นผง ต่อมามีการพัฒนาเครื่องอบแห้งและวิธีการสกัดให้ได้ยาที่เข้มข้นบรรจุเป็นแคปซูลหรือยาเม็ด หรือนำไปผสมกับอาหารเสริมชนิดต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตเห็ดถั่งเช่าขายในรูปเห็ดอบแห้ง และในรูปบรรจุเป็นแคปซูลในหลายประเทศทั่วโลก สำหรับราคาเห็ดถั่งเช่าสีทองในประเทศไทยที่ขายในรูปเห็ดอบแห้ง มีราคาตั้งแต่กิโลกรัมละ 20,000 บาท ถึง 150,000 บาท ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองหลังจากเก็บเกี่ยวและอบแห้งแล้วจะบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์

ชนิดต่างๆ เพื่อจำหน่าย เช่น กล่องพลาสติกสุญญากาศ ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค หรือถุงพลาสติกชนิดต่างๆ เป็นต้น อย่างไรก็ตามถึงแม้ดอกเห็ดจะผ่านการอบแห้งแล้วแต่ถ้าเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่เหมาะสมก็จะส่งผลต่อการสูญเสียสภาพและสารสำคัญทางยาชนิดต่างๆ ที่อยู่ในดอกเห็ด หรืออาจปนเปื้อนเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้ นอกจากนี้การเสื่อมสภาพของดอกเห็ดยังอาจส่งผลให้เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญมีค่าลดลงได้ เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกซิเดส ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD), คะตะเลส (catalase; CAT) และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POX) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวชี้วัดการเสื่อมสภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ ในปัจจุบันมีข้อมูลเกี่ยวกับการวัดคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะต่างๆ ไม่มากนัก ส่วนใหญ่จะทำการศึกษากับเห็ดสดชนิดอื่นๆ เช่น เห็ดนางรม (Jayathunge, & Illeperuma, 2001, pp. 69-77) เห็ดเห็ดซิเมจิ (Xing, Z., 2008, pp. 11838-11844) เห็ดเป๋าฮื้อก้านยาว (สุพัตรา เปี่ยมวารี และคณะ, 2011, น. 665-668) เป็นต้น จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งหลังการเก็บเกี่ยวในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เพื่อจะได้ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองที่หลังจากอบแห้งแล้วให้สามารถยืดอายุและคงคุณภาพให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในทางการค้าต่อไป

การเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญในการผลิตเห็ดถั่งเช่าเนื่องจากจะทำให้สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไม่กลายพันธุ์ หรือสูญเสียคุณสมบัติของสายพันธุ์เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในรุ่นต่อๆ ไป ในฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองหลายๆ แห่งจะไม่ค่อยนิยมเก็บหัวเชื้อไว้เองเนื่องจากมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก และค่าจ่ายสูง หรืออาจยังไม่เข้าใจกระบวนการขั้นตอนของการเก็บรักษาที่ดีพอ ในขณะที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงบางแห่งที่เก็บรักษาหัวเชื้อเองจะเลือกใช้วิธีที่ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น เมื่อต้องการนำมาใช้เพาะเลี้ยงก็จะทำการต่อเชื้อลงในอาหารใหม่ (sub-culture) ไปเรื่อยๆ หลายๆ รุ่น ซึ่งวิธีการนี้มีข้อเสียคืออาจทำให้เกิดการปนเปื้อนและเกิดเชื้อกลายพันธุ์ส่งผลต่อคุณภาพด้านผลผลิตได้ ในรายงานของ Sung et al. (2006, pp. 196-199) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น Sabouraud Dextrose agar plus Yeast Extract (SDAY) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการต่อเชื้อจำนวน 10 รุ่น ในแต่ละรุ่นของการต่อเชื้อทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกในอาหารข้าวผสมดักแด้ไหม พบว่า เมื่อทำการต่อเชื้อจำนวน 2 ครั้งขึ้นไปเชื้อจะเริ่มมีความเปลี่ยนแปลง โดยสีของโคโลนีเปลี่ยนแปลงไปมากขึ้นและการพัฒนาไปเป็นดอกจะลดลง จากข้อมูลดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ให้มีคุณภาพ โดยประเมินด้านการมีชีวิตอยู่ของเชื้อ (viability) การปนเปื้อน (contamination) และการคงสภาพของเชื้อ (stability) หลังการเก็บรักษาเพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อไป

การวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนใหญ่จะวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography) (Huang et al., 2009, pp. 957-961; Zhao et al., 2014, pp. 271-289) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และมีการทำลายตัวอย่าง เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (Near Infrared Spectrocsopy; NIRS) ใช้หลักการการสร้างสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correction, R) ระหว่างค่าการดูดซับแสง Near Infrared ที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนหนึ่ง และค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (SEP) ต่ำ จึงนำสมการที่ได้ไปใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิค NIRS คือ เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์รวดเร็ว ประหยัดเวลา และปลอดภัย สามารถใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ และในระยะยาวสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ ปัจจุบันเทคนิค NIRS เป็นเทคนิคที่ใช้อย่างแพร่หลายในต่างประเทศและสามารถใช้ได้ในหลายกลุ่มอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมเกษตร (Shenk, Workman, & Westerhaus, 1992, pp. 383-431; Ritthiruangdej et al., 2011, pp. 684-692; Narongwongwattana, Rittiron, & Hock, 2015, pp, 181-188) อุตสาหกรรมอาหาร (Ghosh, & Rodgers, 1992, pp. 495-525; Cen, & He, 2007, pp. 72-83; Prieto et al., 2017, pp. 1403-1426) อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง (Prajapati et al., 2016, pp. 117-123) เป็นต้น สำหรับงานวิจัยที่ทำการประเมินสารต่างๆ ในเห็ดถั่งเช่าโดยใช้เทคนิค NIRS นั้นยังมีไม่มากนัก มีรายงานความสำเร็จในการประเมินหาปริมาณสารอาร์จินีน (arginine) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าทิเบต (Xie et al., 2015, 971-977) และมีรายงานเกี่ยวกับการประเมินหาปริมาณสารอะดีโนซีน และสารโพลีแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Chang-ji et al., 2009, pp. 578-582) อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยใดที่ทำการประเมินหาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ได-เซปินในส่วนที่เป็นดอกเห็ด หรือสโตรมา ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค NIRS มาประยุกต์ใช้ในการประเมินหาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้งสองชนิดแทนการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรากลุ่มนี้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

2. เพื่อศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว

3. เพื่อศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งหลังการเก็บเกี่ยวต่อการเปลี่ยนแปลงด้านคุณภาพ

4. เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่แตกต่างกันต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์

5. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS)

ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ในปัจจัยต่างๆ เดียวกัน ได้แก่ สูตรอาหาร สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ทำการประเมินผลการทดลองจากส่วนที่เป็นดอกเห็ด (fruiting body) หรือสโตรมา (stroma) ในด้านผลผลิต ได้แก่ จำนวนดอก และน้ำหนักสด ด้านลักษณะทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ลักษณะรูปร่าง ขนาด สี ความแน่นเนื้อ (firmness) ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid; TSS) และปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน จากนั้นทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อรากลุ่มนี้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

การทดลองที่ 2 ทำการศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารข้าวจำนวน 16 สูตร ประกอบด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกันจำนวน 15 สูตร และสูตรอาหารที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) จำนวน 1 สูตร โดยทุกสูตรอาหารจะเพาะเลี้ยงในปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อมเดียวกันและใช้ระยะเวลาเท่ากัน บันทึกผลการทดลองโดยประเมินผลด้านการเจริญเติบโต ได้แก่ ระยะเวลา

ในการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเพาะ และระยะเวลาที่เกิดเป็นตุ่มดอก ด้านผลผลิต ได้แก่ จำนวนดอก และน้ำหนักสด ด้านคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ขนาด สี ความแน่นเนื้อ ค่า TSS และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ อะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน ต่อมาทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ดีที่สุด โดยทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองบนสูตรอาหารที่ดีที่สุดอีกครั้งในสภาวะเดียวกัน ทำการประเมินผลระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดอกเห็ด และการผลิตสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้ในช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุด

การทดลองที่ 3 ทำการศึกษาผลของชนิดบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งหลังการเก็บเกี่ยวต่อการเปลี่ยนแปลงด้านคุณภาพ โดยทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่เหมือนกันจำนวน 500 ขวด เป็นเวลา 60 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมดมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ก่อนการเก็บรักษา ได้แก่ น้ำหนัก สี ความแน่นเนื้อ ค่า water activity (a_w) ค่า TSS ปริมาณสารอะดีโนซีน ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), เอนไซม์ catalase (CAT) และ peroxidase (POX) จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่างละ 2.50 กรัม เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างกันจำนวน 6 สภาวะการทดลอง เปรียบเทียบกับตัวอย่างเห็ดที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิต่ำ 5°C และอุณภูมิห้อง 30 (±5)°C ซึ่งกำหนดให้เป็นตัวเปรียบเทียบ (negative control) ใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษา 12 เดือน ทำการบันทึกผลโดยเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เพื่อประเมินผลหาค่าต่างๆ ทุกเดือน

การทดลองที่ 4 ทำการศึกษาผลของการเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิคต่างๆ ที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของสายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็งพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) เป็นเวลา 14 วัน และกำหนดให้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษาเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ (control) จากนั้นนำเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นมาแบ่งเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันจำนวน 8 วิธีการ เป็นระยะเวลา 12 เดือน ทำการเก็บตัวอย่าง 3 ช่วงการทดสอบ คือ เดือนที่ 4, 8 และ 12 วิเคราะห์ประเมินผลในด้านต่างๆ คือ 1) การรอดชีวิตของเชื้อ (viability) ได้แก่ จำนวนของจานอาหารเพาะเลี้ยงที่เส้นใยเห็ดมีการเจริญและขนาดโคโลนีของเส้นใยที่เจริญบนอาหารวุ้น PDA 2) ความบริสุทธิ์ของเชื้อ (purity) โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) จากจำนวนจานอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการปนเปื้อน 3) การคงสภาพของ

เชื้อ (stability) ได้แก่ จำนวนดอก น้ำหนักสด ความแน่นเนื้อ สี ค่า TSS และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน ในขณะเดียวกันก็ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ในปัจจัยและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมือนกัน แล้วประเมินหาค่าต่างๆ ที่ต้องการศึกษาเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

การทดลองที่ 5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) โดยทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ต่างๆ ที่แตกต่างกันในอาหารข้าวที่มีสูตรแตกต่างกันให้ได้จำนวนตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 39 ตัวอย่างเพื่อเตรียมใช้ในการสร้างสมการ (calibration) และทดสอบสมการ (validation) ทำการศึกษารูปแบบของตัวอย่างที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ก่อนนำไปวัดสเปกตรัม (spectrum) ด้วยเครื่อง NIR spectrometer เพื่อประเมินหารูปแบบที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสมการเพื่อทำนายค่าสารที่ต้องการ ทำการทดสอบสมการอีกครั้งโดยคัดเลือกสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างทั้ง 4 รูปแบบ มาทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินกับตัวอย่างใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC และวิเคราะห์ค่าสถิติของสมการ

ข้อตกลงเบื้องต้น

การสุ่มตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพต่างๆ ในแต่ละครั้งตามแต่ละวิธีการทดลองให้เปรียบเสมือนว่าเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดที่ถูกสุ่มตรวจ

นิยามศัพท์เฉพาะ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) หมายถึง ราแมลงสายพันธุ์หนึ่งที่อยู่ในคลาส Ascomycete มีลักษณะเด่นคือดอกหรือสโตรมา (stroma) มีสีเหลืองส้ม จัดเป็นเห็ดสมุนพรจีนที่นิยมนำมาใช้รักษาโรค และบำรุงร่างกายเนื่องจากมีสารสำคัญทางยาสูง

อะดีโนซีน (adenodine) หมายถึง สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ประเภทหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น เป็นอนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิกที่โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลจับกับเบสอะดีนีน จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในการทำงานของหัวใจ ป้องกันหัวใจล้มเหลว เป็นต้น

คอร์ไดเซปิน (cordycepin) หมายถึง สารทุติยภูมิอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของสารอะดีโนซีน มีโครงสร้างคล้ายกันกับอะดีโนซีน แต่ต่างกันที่ตรงตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่ 3 ของน้ำตาลไม่มีออกซิเจนมาจับกับไฮโดรเจน จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญในการ

ยับยั้งเชื้อจุลชีพก่อโรคชนิดต่างๆ ช่วยเพิ่มออกซิเจนเข้าสู่กระแสเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อต้านอนุมูลอิสระ และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

เทคนิค Random Amplify Polymorphic DNA (RAPD) หมายถึง เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 10-12 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน

อาหารสังเคราะห์ หรืออาหารเทียม (artificial culture media) หมายถึง อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการประกอบด้วยคุณค่าทางอาหารที่ใกล้เคียงกับอาหารที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ

อายุการเก็บรักษา (shelf life) หมายถึง ช่วงระยะเวลาที่อาหารอยู่ในบรรจุภัณฑ์และการเก็บรักษาในสภาวะที่กำหนด ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารให้อยู่ในระดับที่กำหนดได้

เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) หมายถึง การตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยการใช้พลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าย่านความถี่ Near Infrared ที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive quality evaluation)

สมมติฐานของการวิจัย

1. สายพันธุ์ที่มาจากแหล่งที่ต่างกันจะมีความแตกต่างกันด้านผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเทคนิค RAPD สามารถจำแนกความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ได้

2. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสูตรอาหารที่แตกต่างกันจะทำให้เส้นใยมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของดอกเห็ดที่แตกต่างกัน รวมถึงมีการผลิตสารสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่แตกต่างกันด้วย

3. การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งหลังจากเก็บเกี่ยวในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน จะทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพได้แตกต่างกัน

4. การเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของหัวเชื้อได้แตกต่างกัน

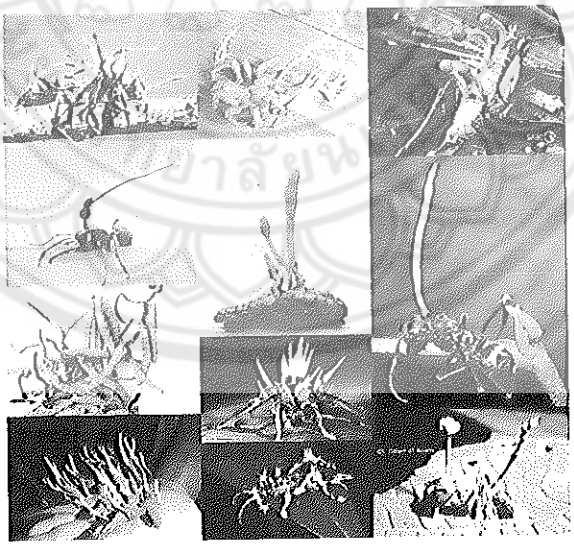
5. เทคนิค NIRS สามารถทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ โดยถ้ารูปแบบของตัวอย่างที่นำมาใช้วัดมีความแตกต่างกันจะทำให้ประสิทธิภาพในการประเมินมีความแตกต่างกัน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเห็ดถั่งเช่า

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps* mushroom) เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตในแมลง อาจจะอยู่ร่วมกับแมลงที่มีชีวิต หรือทำให้เกิดโรคและสามารถฆ่าแมลงได้ โดยราที่เจริญเติบโตในแมลงที่มีชีวิตนั้นจะอยู่ในรูปของเซลล์ยีสต์ซึ่งเรียกว่า Yeast-Like Endosymbionts (YLSs) และจะสามารถเปลี่ยนรูปเป็นลักษณะที่มีเส้นใย (filamentous) ได้ ซึ่งจะเป็นลักษณะที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic) แต่ในขณะที่อยู่ในรูปของ YLSs นั้น จำเป็นที่แมลงต้องมีชีวิต เนื่องจากปัจจัยสำคัญในการเจริญของ YLSs คือ สารอินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากตัวแมลง ซึ่ง YLSs จะมีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงที่อาศัย (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 9) จนกระทั่งในที่สุดแมลงตาย ราต้องหาเจ้าบ้านใหม่ โดยการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีสปอร์งอกออกมาจากซากแมลงเห็นเป็นก้านคล้ายดอกเห็ด หรือ ฟรุ้ทติ้งบอดี้ (fruiting body) ซึ่งเรียกว่า "สโตรมา" (stroma) ดังภาพ 1



ภาพ 1 ลักษณะของราที่เจริญและงอกออกจากแมลงหรือเจ้าบ้านชนิดต่างๆ

ที่มา: Lazer, 2014

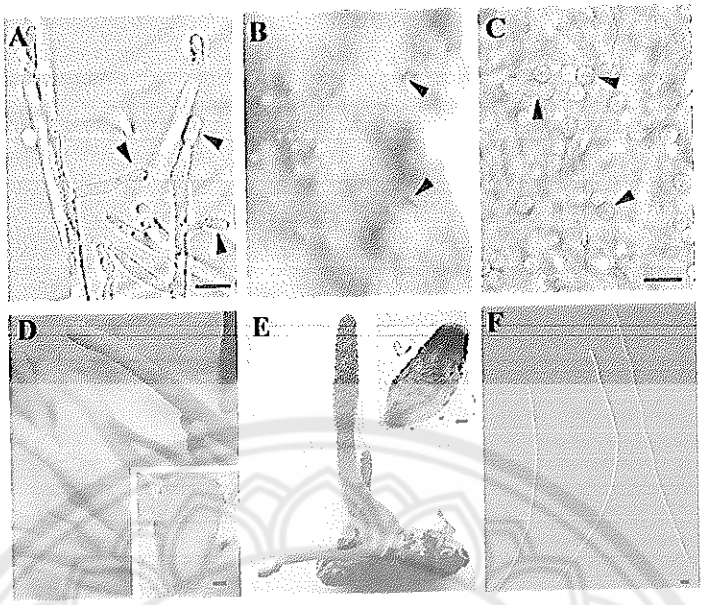
1. เห็ดถั่งเช่าและการจัดจำแนก

เห็ดถั่งเช่า เป็นราแมลงที่มีฤทธิ์ทางยาและถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยส่วนใหญ่จะเป็นราแมลงที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes และมีอยู่หลายจีนัส เช่น Ophicordyceps sp., Cordyceps sp., Paecilomyces sp. และ Isaria sp. เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสกุลคอร์ไดเซป (*Cordyceps* (Fr.) Link) จัดว่าเป็นราแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างสูง ปัจจุบันมีการศึกษา รวบรวม จำแนก เพาะเลี้ยง ปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่า และผลิตเป็นการค้าในประเทศจีน เกาหลี ไต้หวัน อินเดีย สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย และสิงคโปร์ โดยมีการใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ และเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เนื่องจากมีการค้นพบเห็ดถั่งเช่าจำนวนหลายสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ เห็ดถั่งเช่าบางชนิดมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันแต่อาจไม่ใช่สายพันธุ์เดียวกัน หรือเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์เดียวกันแต่เกิดในสถานที่แตกต่างกันก็อาจมีความแตกต่างกันในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ Hywel-Jones (1994, pp. 939-942) ได้รายงานการค้นพบเห็ดถั่งเช่าและราแมลงสายพันธุ์ใหม่ 2 ชนิด คือ *C. khaoyaiensis* และ *C. pseudomilitaris* ในเขตร้อนของประเทศไทย ซึ่งเห็ดทั้งสองสายพันธุ์ที่ค้นพบนี้มีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์ *C. vinosa* และ *C. militaris* ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospores) โดย *C. pseudomilitaris* ไม่พบการสร้าง ascospore และได้รายงานเพิ่มว่าเส้นใยที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น anamorph ชนิด *Hirsutella* sp. ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์ และคณะ (2543, น. 149-163) ได้รายงานเกี่ยวกับเชื้อราแมลง *C. pseudomilitaris* ที่แยกได้ในประเทศไทยว่ามีรูปร่างลักษณะสัณฐานคล้ายคลึงกับ *C. militaris* แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบเชิงคุณลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันเมื่อนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ในปี วารุณี บวรรัตโตภาค และคณะ (2545, น. 21-31) ได้ศึกษาสำรวจความหลากหลายของราสกุลคอร์ไดเซปจากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพและดอยปุย พบว่า พบราสกุลนี้มากถึง 80 ชนิด เชื้อราสกุลคอร์ไดเซปอยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae ที่มีความหลากหลายของจำนวนชนิดและแมลงอาศัยมากที่สุด แมลงเจ้าบ้านของราแมลงสกุลคอร์ไดเซปมีมากมายหลายชนิด เช่น มด ผึ้ง ต่อ แตน แมงมุม เพลี้ยด้วง แมลงปอ ผีเสื้อ และหนอน โดยทั่วไปราแมลงจะมีความจำเพาะกับแมลงเจ้าบ้านชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น หรือใกล้เคียงแมลงเจ้าบ้านชนิดนั้นๆ และไม่เป็นอันตรายกับคน แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อราแมลงเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถรับประทานได้ ธัญญา ทะพิงค์แก (2555ข, 113-117) รายงานความสำเร็จในการคัดแยกสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*; CMRU) จากธรรมชาติ ได้จำนวน 15 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CMRU1-CMRU15 ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวและบนอาหารแข็งที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสายพันธุ์ CMRU ทั้ง 15 สายพันธุ์ ยังมีความแปรปรวนสูง

ในด้านการผลิตสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2,000-8,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่คัดแยก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Stensrud et al. (2005, pp. 41-56) และ Wang et al. (2008, pp. 147-155) ที่ได้รายงานว่าเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่พบในพื้นที่ต่างกันอาจมีความต่างชนิดกัน และมีการผลิตสารคอร์ไดเซปินในปริมาณแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราเห็ดถังเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU1-CMRU15 โดยนำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านขนาด รูปร่าง สีของดอกเห็ด การเจริญเติบโตของเส้นใย บางสายพันธุ์ไม่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด และบางสายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มในระยะดอกเห็ด ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นได้ว่าสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองในธรรมชาติมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม อาจส่งผลต่อการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าได้ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการจำแนกและระบุเอกลักษณ์ของชนิดพันธุ์ ในการจัดจำแนกและระบุเอกลักษณ์สายพันธุ์อาจทำได้โดยการศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) หรือโดยวิธีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1.1 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เนื่องจากเห็ดถั่งเช่าจัดเป็นราแมลงที่อยู่ในสกุลคอร์ไดเซพ (*Cordyceps* (Fr.) Link) ที่พบในหลากหลายประเทศ เนื่องจากมีความหลากหลายจากสภาพความชื้น และเป็นป่าเขตร้อน ซึ่งราแมลงแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อเจ้าบ้านแตกต่างกัน เชื้อราสกุล Cordyceps ในวงจรชีวิตมีสองระยะคือ ระยะอาศัยเพศ (sexual หรือ teleomorph) และระยะไม่อาศัยเพศ (asexual หรือ anamorph) แต่โดยทั่วไปมักพบในระยะ sexual คือระยะสร้าง fruiting body หรือ สโตรมา ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดราในกลุ่มนี้จึงใช้ลักษณะของ teleomorph หรือระยะที่สร้าง fruiting body เป็นหลัก เนื่องจากเป็นระยะสำคัญที่ทำให้เห็นความแตกต่างกันได้ชัดเจน (Chen et al., 2004, pp. 153-158) เช่นเดียวกับเชื้อราอื่นๆ โดยทั่วไปนิยมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก ตัวอย่างของการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ ได้แก่ การศึกษาลักษณะของ สโตรมา ทั้งรูปร่าง ขนาดความยาว เส้นผ่านศูนย์กลาง เป็นต้น รวมทั้งลักษณะ รูปร่างของเนื้อเยื่อส่วน ascogenous ซึ่งอาจเป็นแบบ glabrous หรือ punctate มี ostioles ที่ ascocarp ที่เป็นแบบ perithecia หรือไม่ ขนาดความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางของ stipes ขนาด รูปร่างของ perithecia จำนวนชั้น ความหนาของเส้นใยที่รวมเป็นเนื้อเยื่อ ขนาด รูปร่างของ asci รวมทั้งขนาด รูปร่าง และสีของ ascospores (ภาพ 2)



ภาพ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*)

หมายเหตุ: (A) บลาสโทสปอร์ (blastospores) (ตามลูกศรชี้) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose broth เป็นเวลา 3 วัน (B) การก่อตัวของตุ่มดอก หรือสโตรมาตา (stromata) (ตามลูกศรชี้) จากเส้นใยหลังจากหยอดเชื้อในอาหารข้าวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (C) การผลิตคอร์นิเดีย (conidia) (ตามลูกศรชี้) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (D) ลักษณะภายในของดอกเห็ด (perithecia) (ภาพเล็กล่างขวา) ของดอกเห็ดที่โตเต็มที่ หลังจากหยอดเชื้อในอาหารข้าวเป็นเวลา 5 สัปดาห์ (E) ลักษณะของ perithecia ในดอกเห็ด (ภาพเล็กบนขวา) ที่โตเต็มที่หลังจากหยอดเชื้อบนดักแด้ไหม (F) ลักษณะของเส้นแอสโคสปอร์ (ascospores) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 10 ไมโครเมตร

ที่มา: Xiong et al., 2010, pp. 25-66

จากการศึกษาของ Liu et al. (2011, pp. 189-195) ที่ได้ศึกษาการจำแนกสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่งเช่าตระกูล Cordyceps ทั้งสายพันธุ์แท้ (*C. sinesis*) และสายพันธุ์อื่นๆ อีก 6 สายพันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า คุณสมบัติของตัวหนอนและสโตรมาของสายพันธุ์ *C. Gunnii* มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *C. sinensis* แต่สโตรมาของสายพันธุ์ *C. gunnii* จะอ้วน ไม่เรียบ และเป็นหมันที่ยอดของสโตรมามีลักษณะปูดออกมา ส่วนยอดของ *C. Sinensis* เป็นทรงกระบอกเรียวยาว

ตัวหนอนของสายพันธุ์ *C. sinensis* มีเท้า 8 คู่ อยู่บนหน้าท้องตรงกลาง 4 คู่ ในขณะที่เท้าของสายพันธุ์ *C. gunnii* จะเห็นได้ไม่ชัดเจน ในสายพันธุ์ *C. barnesii* มีคู่ของฟันบนหัว สายพันธุ์ *C. liangshanensis* ดอกเล็กเหมือนเส้นด้าย สายพันธุ์ *C. gracilis* ไม่มีสโตรมา และสายพันธุ์ *C. militaris* ไม่มีส่วนที่เป็นตัวหนอน เมื่อศึกษาดูเกี่ยวกับลักษณะของตัวหนอนของสายพันธุ์ *C. sinensis* พบว่า ปกคลุมหนาแน่นไปด้วยขนที่มีความยาวแตกต่างกัน และลักษณะของ perithecia เป็นแบบกึ่งฝังตัวที่พื้นผิวในส่วนบริเวณของสโตรมา ในสายพันธุ์ *C. barnesii* ไม่มี perithecia สายพันธุ์ *C. gunnii, C. liangshanensis และ C. gracilis* พบว่าไม่มีขนบนตัวหนอน และมีเส้นใยที่ชัดเจน ข้อจำกัดของการการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ อาจยังไม่มีความละเอียดมากพอ หรือใช้ไม่ได้กับสายพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากๆ อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น ขนาดและสีของดอกเห็ด อาจเป็นผลมาจากอาหารหรือสภาพแวดล้อมที่เห็ดเจริญเติบโต การใช้เกณฑ์สัณฐานเพียงอย่างเดียวจึงอาจทำให้การจำแนกเห็ดชนิดนี้เกิดความคลาดเคลื่อนผิดพลาดได้

1.2 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ เกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 64) ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอและการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงในการจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต (Paterson et al., 1991, pp. 1469-1495) ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค Inter-simple Sequence Repeats (ISSR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) รวมถึงเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่เชื่อถือได้ ทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพง มีไพรเมอร์ให้เลือกจำนวนมาก ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และสามารถทำได้ในสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทราบข้อมูลทางพันธุศาสตร์

1.2.1 หลักการทำ RAPD

RAPD เป็นวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้าง คือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกัน ซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยมคือ ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและใช้วิธีแบบที่เรียกว่าอาร์เอพีดีคิดค้นขึ้นโดย วิลเลียมส์ และคณะในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถวดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 93)

1.2.2 วิธีปฏิบัติ

เทคนิค RAPD ทำได้ง่ายและรวดเร็ว นับว่าเป็นพื้นฐานที่ดีสำหรับผู้ที่จะเริ่มงานทางด้านดีเอ็นเอ วิธีปฏิบัติเริ่มจากการเก็บตัวอย่างที่ต้องการศึกษา นำมาสกัดดีเอ็นเอ วัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ ตรวจสอบคุณภาพ และนำมาทำ PCR โดยสุ่มเลือกไพรเมอร์หลายๆ ชนิด เมื่อเลือกได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้ว จึงวิเคราะห์ RAPD จากตัวอย่างและวิเคราะห์ผลที่ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 94)

1.2.3 วิธีทำ RAPD

ในการทดลองเบื้องต้นต้องตรวจหาไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ก่อน โดยใส่สารต่างๆ ในปฏิกิริยาที่ระดับหนึ่ง เมื่อเลือกไพรเมอร์ที่ต้องการแล้ว จึงทดลองเปลี่ยนแปลงสภาพต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์และอุณหภูมิกับเวลาที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับตัวอย่างที่ทดลอง สำหรับการเริ่มต้นอาจทำการทดลองโดยใส่สารต่างๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 ng/µl)	20 ไมโครลิตร (µl)
บัฟเฟอร์ (10X)	1.5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1.5 µl
dNTP (2 mM)	1.5 µl
ไพรเมอร์ (5 pmole/µl)	1.0 µl

Tag polymerase (5 unit/µl)	0.075 µl
น้ำกลั่น	7.425 µl
รวม	15 µl

ถ้าใช้เครื่อง PCR ที่ไม่มีระบบให้ความร้อนที่ฝาให้เติม paraffin oil 1-2 หยด ถ้าเป็นเครื่อง PCR ที่ฝาไม่ต้องหยดน้ำมันปิดหน้าสารละลาย นำมาทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลา ดังนี้

ขั้นที่ 1 94 °C 3 นาที

ขั้นที่ 2 94 °C 1 นาที (สำหรับ denature)

37 °C 1 นาที (สำหรับ annealing)

72 °C 2 นาที (สำหรับ primer extension)

ทำซ้ำ 40 รอบ

ขั้นที่ 3 72 °C 5 นาที เพื่อให้เกิด primer extension สมบูรณ์ แล้วเก็บไว้ที่ 4 °C จนกว่าจะนำมาทำอิเล็กโทรดฟรีซิส (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 95)

1.2.4 การวิเคราะห์ผลของ RAPD

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้ สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น "+" หรือให้คะแนนเป็น "1" ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น "-" หรือให้คะแนนเป็น "0" ในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อยๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวจางหรือไม่ชัดเจน หรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกัน เนื่องจากเจลเกิด smile อันมีสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ไปช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง เป็นต้น ในกรณีดังกล่าวนี้ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจน ไม่อาจบอกได้แน่ชัด ให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิด การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตาหรือใช้เครื่องอ่านก็ได้ เปรียบเทียบความเหมือนของแถบของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่โดยใช้ค่า similarity index (S) โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย และ S = 1 หมายถึง ทั้งสองตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, น. 101)

จากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัย ทำให้พอสรุปเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อจำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราเห็ดถั่งเช่า และเห็ดชนิดอื่น ตัวอย่างเช่น Chen et al. (2004, pp.153-158) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อรา *C. sinensis* จำนวน 29 ตัวอย่าง ที่เก็บในพื้นที่ที่แตกต่างกันจำนวน 3 พื้นที่ในทิเบต ได้แก่ ภาคเหนือ ภาคกลาง และ ภาคใต้ ผลการทดลองพบว่า ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 137 แถบ โดยมี 100 แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) ในเชื้อราแต่ละตัวอย่าง ซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ได้ว่าเชื้อรา *Cordyceps* ที่เก็บตัวอย่างจากต่างพื้นที่กัน มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

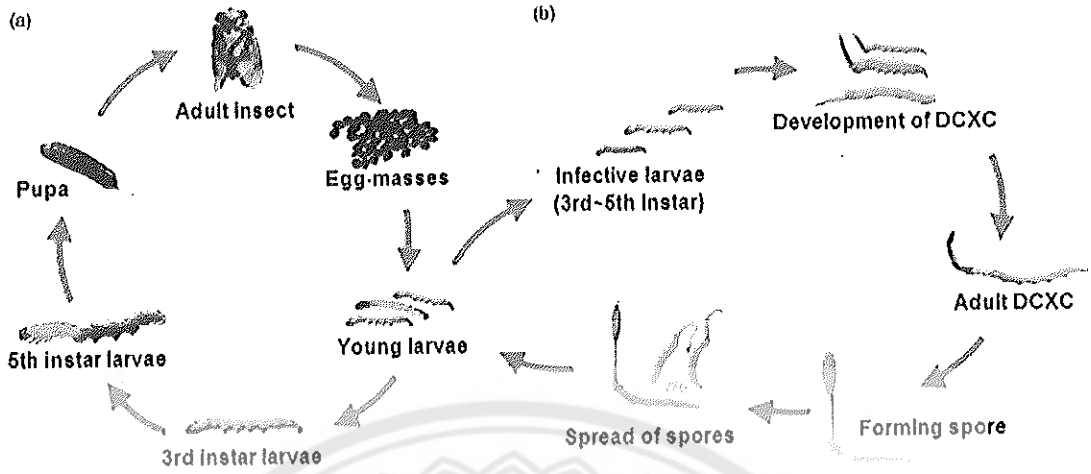
Liang et al. (2008, pp. 549-556) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่า *C. sinensis* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 18 ตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศจีน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด inter-simple sequence repeat (ISSR) marker จำนวน 141 ชนิด ร่วมกับเทคนิค PCR ผลการทดลอง พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. sinensis* ที่สุ่มเก็บจากพื้นที่เดียวกันมีน้อยมาก แต่มีสูงในตัวอย่างที่เก็บจากต่างพื้นที่ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก host insect species ของเชื้อรามีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ซึ่งผลการทดลองนี้อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการเลือก host insect species ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อราเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตยา และการอนุรักษ์พันธุกรรมของเชื้อรา

เรือนแก้ว ประพฤติ, และดนุวัติ เพ็งอ้น (2553, น. 29-38) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือจำนวน 9 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 11 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์ได้ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 103 แถบ เป็นแถบที่ต่างกัน 89 แถบ คิดเป็นร้อยละ 86.40 มีแถบดีเอ็นเอที่พบเฉาะในบางสายพันธุ์ 21 แถบ มีจำนวนไพรเมอร์จาก 11 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในตัวอย่า MG3 เท่านั้น การจัดกลุ่มตามความสัมพันธุ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่า สายพันธุ์ MG3 และ MG4 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับอีก 7 สายพันธุ์ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ISSR สามารถนำมาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและใช้ระบุเอกลักษณ์ประจำสายพันธุ์ของเห็ดหลินจือได้

2. วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

เห็ดถั่งเช่าส่วนใหญ่จะชอบเจริญเติบโตบนที่ราบสูงและอากาศเย็น ธัญญา ทะพิงค์แก (2555ข, น. 22) ได้อธิบายวงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าว่า เมื่อสปอร์ของเชื้อราได้ล่วงล้ำเข้าไปในวงจรชีวิตของแมลง ซึ่งอาจเกิดจากสปอร์เชื้อราตกลงบนที่ตัวแมลง หรือจากการที่แมลงกินอาหารที่ปนเปื้อนราเข้าไป โดยสปอร์ของเชื้อราเข้าไปอาศัยแบบปรสิต (parasite) สปอร์ของเชื้อราที่อยู่ในตัวหนอนมีการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นเส้นใย (hyphae) จากนั้นเส้นใยของราจะฝังตัวเข้าสู่

อวัยวะภายในและเจริญเติบโตอยู่ในตัวแมลงด้วยการกินอาหารจากตัวแมลงนั้น จากนั้นราที่เป็นปรสิตจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนสามารถเข้าไปแทนที่อยู่ในลำตัวของแมลงนั้นทั้งตัว และอัดตัวกันแน่นในตัวหนอนเรียกว่า "สเคอโรเตียม" (sclerotium) แล้วพัฒนาเป็นอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะคล้ายดอกเห็ดหรือก้านสปอร์แล้วแทงทะลุผ่านส่วนหัวของตัวหนอน (perithecial stroma) แล้วพัฒนาเป็นก้านสปอร์อยู่เหนือผิวดินเพื่อสร้างสปอร์สำหรับการขยายพันธุ์ต่อไป ตัวอย่างเช่นในวงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าทิเบต เห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่ขึ้นค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับตัวหนอนผีเสื้อค้างคาว (*Thitarodes* sp.) หรือผีเสื้อกะโหลก (ghost moth) ซึ่งอยู่ตามที่ราบสูงแถบภูเขาหิมาลัยในทิเบต เนปาล ภูฐาน อินเดีย และจีน ความสูงระหว่าง 3,500-5,000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล การเกิดขึ้นของถั่งเช่าทิเบตเข้าใจว่าช่วงฤดูหนาวหนอนผีเสื้อขุดรูลงไปอยู่ใต้ดินเพื่อหลบอากาศหนาวซึ่งหนอนผีเสื้อได้รับเชื้อราแมลงจากสภาพแวดล้อมหรือจากการที่ตัวหนอนกินอาหารปนเปื้อนเชื้อราเข้าไป เชื้อจะเจริญภายในตัวหนอนทำให้หนอนตาย โดยผิวนอกลำตัวของตัวหนอนยังอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ที่เราเห็นว่าเห็ดเป็นตัวหนอนนั้นเป็นเฉพาะเปลือกภายนอกเท่านั้น ข้างในตัวหนอนจะถูกอัดแน่นไปด้วยเส้นใยของราแมลง เมื่ออากาศอบอุ่นขึ้นเส้นใยในตัวหนอนจะรวมกันเป็นดอกคล้ายๆ ต้นหญ้างอกออกมาต้นหนึ่งตรงที่ส่วนหัวของหนอน รูปลักษณะภายนอกคล้ายไม้กระบองยาวประมาณ 5-10 เซนติเมตร ส่วนตัวหนอนคงอยู่ในลักษณะของหนอนตายซากอยู่เช่นนั้น ดังนั้นเห็ดถังเช่า จึงประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญสองส่วนคือ ส่วนที่เชื้อราเจริญอยู่ในตัวหนอนเรียกว่า endosclerotium และส่วนที่เป็นก้านคล้ายดอกเห็ด หรือฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting body) ที่โผล่ออกมาจากส่วนหัวของตัวหนอน เรียกว่า "สโตรมา" (stroma) (Buenz et al., 2005, pp. 19-29; Shrestha et al., 2010, pp. 228-236) ดังภาพ 3



ภาพ 3 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

หมายเหตุ: (a) คือ วงจรชีวิตของผีเสื้อหัวกะโหลก (b) วงจรชีวิต ของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่เจริญในหนอนผีเสื้อหัวกะโหลก

ที่มา: Zhou et al., 2014, pp. 233-243

3. **สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณของเห็ดถั่งเช่า**

เห็ดถั่งเช่าหลายชนิดมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญทางด้านเภสัชวิทยา เห็ดเหล่านี้เป็นที่รู้จักกันว่าเป็นเห็ดสมุนไพรใช้รักษาโรคมานานนับพันปี ชาวจีนเชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ มีสรรพคุณช่วยปรับสมดุลของร่างกาย เป็นสมุนไพรธาตุร้อน มีการบันทึกในตำหรับยาแผนโบราณของชาวทิเบตว่าเห็ดถั่งเช่าถูกใช้เป็นยาชูกำลัง ใช้รักษาสารพัดโรค (Winkler, 2008, pp. 291-305) ตามหลักฐานทางประวัติศาสตร์จีนก็มีการบันทึกการใช้เห็ดถั่งเช่าไว้ว่ามีการใช้เป็นยามาตั้งแต่สมัยราชวงศ์ถัง (ประมาณ ค.ศ. 618-907) ด้วยความที่เห็ดชนิดนี้หาได้ยากและมีราคาสูงจึงถูกจำกัดการใช้เฉพาะจักรพรรดิและเชื้อพระวงศ์ของจีนเท่านั้น และเริ่มเป็นที่รู้จักในโลกตะวันตกจากการที่หมอสอนศาสนาได้นำตัวอย่างของเห็ดถั่งเช่าที่ได้รับจากองค์จักรพรรดิจีนไปเข้าร่วมแสดงที่งานประชุมทางวิชาการในกรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส ในปี 1726 ซึ่งถือว่าเป็นการแนะนำเห็ดถั่งเช่าต่อศาสตร์การแพทย์แผนตะวันตก อันนำมาซึ่งงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์มากมายถึงคุณประโยชน์ต่อร่างกาย เห็ดถั่งเช่าที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมและทางการค้ามี 4 ชนิด คือ เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*O. sinensis* หรือชื่อเดิม *C. sinensis*) เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militalis*)

เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Paecilomyces tenuipes* หรือ *Isaria japonica*) และถั่งเช่าจักจั่น (*P. cicadae* หรือ *I. sinclairii*) (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 11)

3.1 เห็ดถั่งเช่าทิเบต

เห็ดถั่งเช่าทิเบต หรือถั่งเช่าแท้ มีชื่อภาษาไทยหลายชื่อ เช่น หนอนเทวดา หนอนพิสดาร หญ้าหนอน หนาวเป็นหนอน ร้อนเป็นหญ้า (worm in einter and glass in winter) ภาษาจีนเรียกว่า ตงฉงเซี่ยเฉ่า (Dong chong xia cao) หรือ ฉงเฉ่า (Chong cao) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Ophioccordyceps sinensis* (Berk.) หรือชื่อเดิมคือ *Cordyceps sinensis* เป็นถั่งเช่าชนิดแรกที่คนเริ่มรู้จัก ทำให้มีชื่อเสียงและมีค่ามากที่สุดในบรรดาราแมลงในสกุลเห็ดถั่งเช่า เห็ดชนิดนี้จะเจริญเติบโตจากตัวอ่อนของผีเสื้อกลางคืน (ภาพ 4) ที่อยู่บนเทือกเขาหิมาลัยที่มีความสูงกว่า 3,500 เมตร จากระดับน้ำทะเล ดังนั้นจึงมีความยากลำบากในการหาถั่งเช่าทิเบตอย่างมาก ปัจจุบันเห็ดถั่งเช่าทิเบตในธรรมชาติมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากเป็นเห็ดที่ตลาดมีความต้องการสูง จึงทำให้เห็ดชนิดนี้มีราคาสูงมากจนได้รับสมญานามว่า "ทองคำแห่งสมุนไพรจีน" ราคาของเห็ดถั่งเช่าทิเบตขึ้นอยู่กับขนาดและคุณภาพ ยิ่งตัวใหญ่ราคายิ่งสูง มีตั้งตั้งแต่ราคาสามแสนถึงหนึ่งล้านบาท ในด้านการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าทิเบตนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง วิธีสกัดสารออกฤทธิ์ และอื่นๆ อีกมากมายในประเทศจีนและเกาหลีใต้ แต่อย่างไรก็ตามเห็ดถั่งเช่าทิเบตมีขั้นตอนการเพาะให้เกิดดอกค่อนข้างยุ่งยาก และมีข้อจำกัดในเรื่องของอุณหภูมิเนื่องจากต้องการอากาศเย็น จึงทำให้มีการศึกษาเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเติมเพื่อที่จะนำมาทดแทนเห็ดถั่งเช่าทิเบต ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางยาใกล้เคียงกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต และสามารถเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกได้ง่ายๆ ไม่ต่างจากการเพาะเห็ดทั่วๆ ไป

อนุกรมวิธานเห็ดถั่งเช่าทิเบต

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Ascomycetes
Order	Hypocreales
Family	Ophioccordyciptaceae
Genus	*Ophioccordyceps*
Species	*sinensis*

ภาพ 4 เห็ดถั่งเช่าทิเบต

ที่มา: Holliday, & Clevaver, 2008, pp. 219-234

การศึกษาค้นคว้าทางเภสัชวิทยา พบว่า เห็ดถั่งเช่าทิเบตมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญทางยาหลายชนิด (Shashidhar et al., 2013, pp. 1013-1030) ได้แก่ สารกลุ่มโพลีแซ็กคาไรด์ เช่น (1 → 3), (1 → 4)-β-D-glucan), แมนนิทอลหรือกรดคอร์ไดเซปิก (mannitol or cordycepic acid) และแมนโนกลูแคน (mannoglucan) เป็นต้น สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Li et al., 2006, pp. 800-805) ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง (Wasser, 2002, pp. 258-274) และมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Yu et al., 2006, 3138-3188) สารกลุ่มนิวคลีโอไซด์ (nucleosides) เช่น อะดีโนซีน (adenosine) อินโนซีน (innosine) กัวโนซีน (guanosine) และคอร์ไดเซปิน (cordycepin) เป็นต้น (Shashidhar et al., 2013, pp. 1013-1030) สารกลุ่มนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานในกลไกของสรีรศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง (Schmidt et al., 2003, pp. 288-297) โดยเฉพาะสารคอร์ไดเซปินมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มพลังภายในร่างกาย สามารถต้านการเกิดเนื้องอก (Dai et al., 2001, pp. 231-240) ต้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรียก่อโรค (Sugar, & McCaffrey, 1998, pp. 1424-1427) และเชื่อว่ามีสรรพคุณที่ช่วยเพิ่มสมรรถนะทางเพศได้ เป็นต้น สารอะดีโนซีนช่วยต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านการเกิดลิ่มเลือดในร่างกาย ลดความเสี่ยงการอุดตันของเส้นเลือดหัวใจและเส้นเลือดในสมองและป้องกันโรคหัวใจขาดเลือด เป็นต้น (Kim, 2010, pp. 784-789) สารกลุ่มสเตอรอล (sterols) เช่น เออโกสเตอรอล (ergosterol) และ เบต้า-ซิสโทสเตอรอล (β-sitosterol) เป็นต้น สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Matsuda et al.,2009, pp. 411-414) นอกจากนี้ยังพบสารชนิดอื่นๆ ในเห็ดถั่งเช่า เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก คอปเปอร์ แมงกานีส สังกะสี เป็นต้น (Bhandari et al., 2010, pp. 253-256)

3.2 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Cordyceps militaris* (L.) Link ลักษณะเด่นของเห็ดถั่งเช่าสีทอง คือ สโตรมาหรือดอกจะเป็นก้านยาวเหมือนกระบองและมีสีเหลืองทอง จึงเรียกว่า "เห็ดถั่งเช่าสีทอง" (chainese golden grass) ดังภาพ 5 เนื่องจากถั่งเช่าชนิดนี้จะมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับถั่งเช่าทิเบตนั่นเอง เห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนใหญ่เกิดในตัวหนอน และดักแด้ผีเสื้อ (Lepidopteran) เช่น ไหมป่า (*Bombyx pithyocampa*), *B. caja*, *B. rubi* เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในด้วง เช่น หนอนนก (*Tenebrio moliter*) ในต่อ แตน (Hymenopteran) เช่น ต่อฟันเลื่อย (Cimbex similis) และในแมลงวัน (Dipteran) เช่น แมลงวันแมงมุม หรือยุงยักษ์ (*Tipula paludosa*) เป็นต้น เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นเห็ดที่มีการศึกษาว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดถั่งเช่าทิเบตมากที่สุด มีการวิเคราะห์ว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองมีส่วนประกอบของสารอาหาร วิตามิน

เกลือแร่ และยาหลายชนิดที่สูงกว่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต ที่สำคัญสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ให้เกิดดอกได้ง่ายกว่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต เห็ดถั่งเช่าสีทองจึงได้รับความนิยมมากขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการเพาะเป็นการค้ามานานหลายสิบปีแล้วที่ประเทศจีนทดแทนเห็ดถั่งเช่าทิเบตซึ่งหาได้ยากและมีราคาที่สูงมาก มีการสำรวจตลาดถั่งเช่าสีทองในปี 2008 โดยศูนย์ติดตามการตลาดของจีน ซึ่งระบุว่าความต้องการตลาดนานาชาติปัจจุบันอยู่ที่ 1,000 ตันต่อปี ขณะที่ตลาดภายในจีนอยู่ที่ 500 ตัน อัตราการเจริญของตลาดอยู่ที่ 13% มีผู้ผลิตในจีนประมาณ 50 ราย มีกำลังการผลิตรวมกันประมาณ 250 กรัมต่อไป สำหรับประเทศไทยการขายเห็ดถั่งเช่าสีทองจะขายในรูปเห็ดอบแห้ง ราคาขายกิโลกรัมละหนึ่งแสนห้าหมื่นบาท ถ้าขายเป็นดอกสดในขวดเพาะเลี้ยง ราคาขวดละ 700-800 บาท (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 30)

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาหลายชนิด เช่นเดียวกับเห็ดสกุลถั่งเช่าทิเบต สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทองคือ คอร์ไดเซปิน ซึ่งพบครั้งแรกในเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Cunningham et al., 1951, pp. 2299-2300) มีรายงานหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติทางยาเทียบเท่ากับเห็ดถั่งเช่าทิเบต และมีอีกหลายฉบับรายงานว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีนสูงกว่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต (Huang et al., 2009, pp. 957-961) สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้านและมีคุณสมบัติที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยา เช่น เสริมสมรรถนะทางเพศ ต้านมะเร็งและเนื้องอก ต้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ ช่วยสร้างระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ป้องกันน้ำตาลในเลือดสูง ลดไขมันในเส้นเลือด บรรเทาอาการโรคเบาหวาน ลดการเหนื่อยล้า ป้องกันเซลล์ประสาท ปองกันการเสื่อมสภาพของตับ ไต และปอด เป็นต้น (Das et al., 2010, pp. 961-968) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) และเอนไซม์คะตะเลส (catalase, CAT) ที่สามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการแก่ก่อนวัยอันควร ป้องกันการเกิดฝ้า กระ ริ้วรอยเหี่ยวย่น และโรคเรื้อรังขึ้น เป็นต้น (Wang, Gu and Yuan, 2005, pp. 74-79) ดังนั้นเห็ดถั่งเช่าสีทองจัดว่าเป็นเห็ดเป็นยาที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เห็ดถั่งเช่าจำหน่ายในรูปแบบต่างๆ เช่น แคปซูล ดอกถั่งเช่าแห้งหรือผงชงเป็นชา ถั่งเช่าอัดเม็ด ถั่งเช่าซุปสกัด กาแฟ เป็นต้น

อนุกรมวิธานเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Das et al., 2010, pp. 961-968)

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Ascomycetes/Pyrenomycetes
Order	Hypocreales
Family	Clavicipataceae
Genus	*Cordyceps*
Species	*militaris*

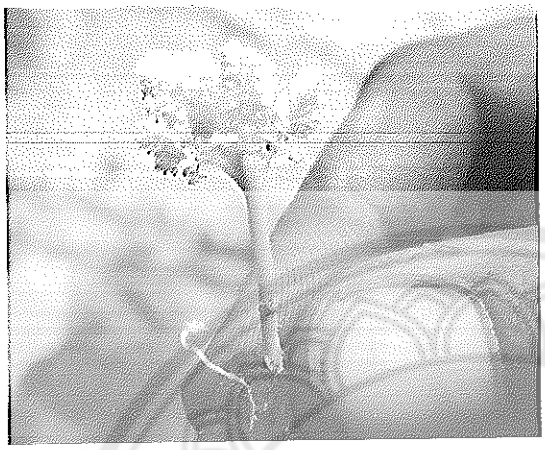
ภาพ 5 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

ที่มา: Wikimedia, 2008

3.3 เห็ดถั่งเช่าหิมะ

เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี (Snowflake Dongchunghacho) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Isaria tenuipes* หรือชื่อเดิม *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson ลักษณะของดอกเห็ดจะมีสีเหลือง หรือสีเหลืองอมเขียว แต่หากเป็นตัวอย่างเก่าก้านชูจะมีสีน้ำตาล หรือสีเหลืองอมน้ำตาล ส่วนปลายเป็นสปอร์สีขาว ดังภาพ 6 เห็ดถั่งเช่าหิมะถูกใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ เป็นยาบำรุงในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีมาตั้งแต่สมัยโบราณ ในช่วงสิบปีที่ผ่านมาเห็ดถั่งเช่าหิมะเป็นที่นิยมบริโภคเป็นอาหารเสริมสุขภาพในประเทศเกาหลี เนื่องจากประชากรมีความเสี่ยงจากการเป็นมะเร็งสูง เห็ดถั่งเช่าหิมะถูกใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง มีการพัฒนาวิธีการเพาะเห็ดถั่งเช่าด้วยหนอนไหมเกิดเป็นอุตสาหกรรมเพาะถั่งเช่าหิมะเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และมีการเปลี่ยนอุตสาหกรรมผลิตเส้นใยไหมไปผลิตเห็ดถั่งเช่าหิมะ โดยพ่นเชื้อราให้กับหนอนไหมและเจริญเต็มที่ตอนที่หนอนไหมเปลี่ยนเป็นดักแด้ดักแด้จะตายลงพอดี จากนั้นทำการตัดเอาดักแด้ออกจากรังไหมนำไปเรียงในถาดเพาะ ซึ่งรองพื้นด้วยกระดาษหรือแผ่นโฟมบางๆ นำถาดไปเรียงบนชั้นเพาะ ให้แสงและความชื้น เชื้อราก็จะงอกดอกเห็ดขึ้นมา จะนำดักแด้ไปอบให้แห้ง นำไปบดเป็นผง ใช้ประกอบอาหารชนิดต่างๆ เช่น เครื่องปรุงรสทั่วไป หรือบรรจุแคปซูลเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ราคาขายกิโลกรัมละประมาณสามหมื่นบาท เห็ดถั่งเช่าหิมะมีสรรพคุณดีมาก แต่ยากต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพราะมีกลิ่นไม่พึงประสงค์ ต่อมานักวิทยาศาสตร์เกาหลีได้พัฒนาเทคโนโลยีในการกำจัดกลิ่น ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสม

ในเครื่องสำอางได้ ช่วยทำให้ผิวกระจ่างใส และทำให้หน้ากระชับตึง (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 32)



อนุกรมวิธานเห็ดถั่งเช่าหิมะ

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Sub-phylum	Ascomycotina
Class	Pyrenomycetes
Order	Hypocreales
Family	Clavicipataceae
Genus	*Isaria*
Species	*tenuipes*

ภาพ 6 เห็ดถั่งเช่าหิมะ

ที่มา: Mushroomobserver, 2009

เห็ดถั่งเช่าหิมะถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษา โรคต่างๆ และเป็นยาบำรุงในจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีมาตั้งแต่สมัยโบราณ (Takano et al., 2005, pp. 903-916) งานวิจัยจากหลายสถาบัน พบว่า ในเห็ดถั่งเช่าหิมะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น อะดีโนซีน ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) สามารถเสริมภูมิคุ้มกัน และป้องกันการเกิดโรคมาลาเรีย (Isaka et al., 2007, pp. 813-823) ยับยั้งและป้องกันการ เกิดเซลล์มะเร็ง รักษาโรคซึมเศร้า (Kan et al., 2010, pp. 1568-1572) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และป้องกันการเกิดอันตรายต่อเซลล์ตับ (Hyun et al., 2007, pp. 301-309) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Lee et al., 2005, pp. 321-325) ลดคลอเรสเตอรอล และไขมันในเลือด (Lee et al., 2006, pp. 214-222) ลดฝ้า จุดด่างดำ และทำให้หน้าขาว (Park et al., 2007, pp. 816-820) เป็นต้น

3.4 เห็ดถั่งเช่าจักจั่น

เห็ดถั่งเช่าจักจั่น หรือเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า "ว่านจักจั่น" หรือ "ว่านเรไร" มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Isaria sinclairii* (Berk.) Llond ซึ่งเป็นชื่อวิทยาศาสตร์ของช่วงที่ไม่มีเพศ (Anamorph) ช่วงที่มีเพศ (Telemorph) คือ *Cordyceps sinclairii* (Fujita et al., 1994, pp. 208-215) เป็นดอกเห็ดที่เกิดขึ้นบนตัวอ่อนของจักจั่น (*Platilomia pieli*) ที่มีเชื้อรา Isaria sinclarii (เดิมใช้ Paecilomyces cicadae) เข้าไปเจริญในลำตัวทำให้จักจั่นตายและงอกดอกเห็ดขึ้นมาจากหัวจักจั่นโผล่พ้นผิวดินขึ้นมาเป็นดอกสีขาว (Xu et al., 2001, pp. 396-402) ดังภาพ 7

อนุกรมวิธานเห็ดถั่งเช่าจักจั่น

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Sub-phylum	Ascomycotina
Class	Sordariomycetes
Order	Hypocreales
Family	Clavicipataceae
Genus	*Isaria*
Species	*sinclairii*

ภาพ 7 เห็ดถั่งเช่าจักจั่น

ที่มา: Wikipedia, 2017

มีรายงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางด้านเภสัชวิทยาในเห็ดถั่งเช่ามากมายซึ่งผู้เขียนได้รวบรวมสรุปมาเป็นบางส่วนดังตาราง 1

ตาราง 1 งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางด้านเภสัชวิทยาในเห็ดถั่งเช่า

ผู้วิจัย	ปี	สาระสำคัญของงานวิจัย
Zhu et al.	1998	ได้ศึกษาคุณสมบัติทางยาของเห็ดถั่งเช่าทิเบตพบว่า สามารถช่วยลดไขมันในเส้นเลือด บำรุงการทำงานของตับและไตให้ดีขึ้น ช่วยลดความวิตกกังวล ลดภาวะหัวใจเต้นผิดปกติ และช่วยบำรุงการทำงานของหัวใจ
Dai et al.	2001	ได้ศึกษาสารสำคัญที่อยู่ในเห็ดถั่งเช่า พบว่า สารสำคัญทางยาในเห็ดถั่งเช่าที่พบคือ สารคอร์ไดเซปิน และกรดคอร์เซปิก มีสรรพคุณช่วยเพิ่มพลังงานภายในร่างกาย และช่วยส่งเสริมการทำงานของตับให้ดีขึ้น
Halpern et al.	2002	ได้รายงานว่าเห็ดถังเช่าทิเบตมีสรรพคุณบำรุงร่างกายแก้อาการอ่อนเพลีย ป้องกันโรคโลหิตจาง แก้ไอเรื้อรัง ละลายเสมหะ รักษาหอบหืด ช่วยให้อสุจิแข็งแรง และเหมาะสำหรับบำรุงกำลังหลังการฟื้นไข้
Schmidt et al.	2003	ได้รายงานว่า เห็ดถั่งเช่าประกอบด้วยสารกลุ่มที่เป็นนิวคลีโอไซด์มากกว่า 10 ชนิด และสารอื่นๆ เช่น คอร์ไดเซปิน อะดีนีน อินโนซีน ไทมีน ไทมิดีน (thaimidine) ดีออกซียูริดีน (deoxyuridine) เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานในกลไกของสรีรศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง
Lee et al.	2005	ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในราแมลงจำนวน 47 สายพันธุ์ พบว่า มีราแมลงที่เป็นสายพันธุ์ของเห็ดถั่งเช่าคือ เห็ดถั่งเช่าหิมะมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส (Bacillus) และได้เชื้อสตาฟิโลคอคคัส (Staphylococcus)
Wang, Gu, & Yuan	2005	ได้รายงานผลการศึกษาของสารอาหาร (แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และโลหะไอออน) ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ SOD CAT และ lipid perioxide (LPO) ในไมซีเลียมของเห็ดถั่งเช่าสีทองช่วงที่

ตาราง 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย	ปี	สาระสำคัญของงานวิจัย
		เจริญในระยะ stationary phase ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่า (shake-flask cultures) โดย พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดเท่ากับ 44.30 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้มันฝรั่ง 20% ผสมกับกลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าสูงสุดเท่ากับ 93.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้มันฝรั่ง 20% ผสมกับกลูโคส 1% เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่า เมื่อเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.1% ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดเท่ากับ 21.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าสูงสุดเท่ากับ 20.70 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเติมทริปโตน (tryptone) ที่ความเข้มข้น 0.1% และสำหรับสารโลหะไอออนนั้นพบว่า เมื่อเติมสาร $Cu2^{+}$, $Zn2^{+}$, and $Mn2^{+}$ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มสูงขึ้น ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ LPO มีระดับต่ำสุดเมื่อเติมสาร $Zn2^{+}$ ลงในอาหารเพาะ
Li et al.	2006	ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าที่เจริญในแมลงเจ้าบ้าน พบว่า เห็ดถั่งเช่าสดในธรรมชาติมีปริมาณนิวคลีโอไซด์อยู่น้อยกว่าอันที่แห้งแล้ว ความชื้นและความร้อนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณนิวคลีโอไซด์ของเห็ดถั่งเช่าที่ขึ้นตามธรรมชาติ การเก็บเห็ดถั่งเช่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 75% ที่อุณหภูมิ 40°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จะทำให้เห็ดถั่งเช่าที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติเพิ่มขึ้น 4 เท่าตัว แต่อย่างไรก็ตามความชื้นและความร้อนไม่มีผลต่อเส้นใยเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยง และเชื่อว่านิวคลีโอไซด์ในเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่ขึ้นตามธรรมชาติต่างจากที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยปกติการวัดคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าจะวัดจากคุณภาพของนิวคลีโอไซด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะดีโนซีน อินโนซีน และคอร์ไดเซปิน และได้มีการศึกษาพบว่า เห็ดถั่งเช่าประกอบไปด้วยโพลีแซคคาไรด์ 3-8% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสารนี้มีส่วนช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระ

ตาราง 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย	ปี	สาระสำคัญของงานวิจัย
Wu et al.	2007	ศึกษาวิจัยประสิทธิภาพสารสกัดจากเส้นใยเห็ดถั่งเช่าทิเบตโดยใช้สารเอทธิลอะซิเตทเป็นตัวสกัด พบว่า สารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสามารถต่อต้านการเกิดเนื้องอกได้ และสามารถยับยั้งการเกิดเซลล์เม็ดสีของอาร์-บูทิน (arbutin) ในหนูทดลองได้
Lin et al.	2007	ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเสปิร์มในหมูจากการกินเห็ดถั่งเช่าทิเบต พบว่า หมูมีอัตราการผลิตจำนวนสเปิร์มเพิ่มขึ้น รวมทั้งยังช่วยเสริมสมรรถนะทางเพศได้
Park et al.	2007	ได้ศึกษาคุณสมบัติของเห็ดถั่งเช่าหิมะ พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเซลล์เม็ดสีของอาร์บูทิน (arbutin) ทำให้ลดการเกิดฝ้าและจุดด่างดำบนผิวหน้าได้
Hur	2008	ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยอาศัยการแยกวิเคราะห์ ใน 2 ส่วน คือ ส่วนดอก (fruiting body) และในส่วนลำตัวหนอน (corpus) พบว่า มีสารทางยา คือ กรดอะมิโน ในปริมาณ 69.32 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 14.03 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แสดงว่าส่วนของดอกมีปริมาณ กรดอะมิโน มากกว่าส่วนของตัวหนอน และ นอกจากกรดอะมิโนแล้วก็ยังมีสารทางยาที่สำคัญอีก 2 ตัว คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน โดยพบว่า สารอะดีโนซีนสามารถพบในปริมาณที่สูงถึง 0.18% ในส่วนของดอกและ 0.06% ในส่วนของลำตัวหนอน ส่วนสารคอร์ไดเซปินมีปริมาณ 0.97% ในส่วนของดอก และ 0.36% ในส่วนของลำตัวหนอน
Lui et al.	2008	ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเห็ดถั่งเช่าทิเบตกับคนไข้ที่ผ่านการฉายรังสีรักษาโรคมะเร็ง พบว่า ช่วยทำให้คนไข้ฟื้นตัวได้ดีขึ้น
Ji et al.	2009	ได้ศึกษาสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าทิเบต คือ ดี-กาแลกโทส (D-galactose) ที่มีผลต่อการชะลอความชราในหนู พบว่า ดี-กาแลคโทสสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase เอนไซม์ glutathione

ตาราง 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย	ปี	สาระสำคัญของงานวิจัย
		peroxidase และเอนไซม์ catalase ภายในร่างกายหนูได้มากขึ้น ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้ชะลอความชราได้
Hong et al.	2009	ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเชื้อราถั่งเช่าที่เจริญในหนอนไหม 3 สายพันธุ์ คือ *C. militaris*, *C. pruinosa* และ *Paecilomyces tenuipes* องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ (กลีเซอรอล, กลูโคส, แมนนิทอล และน้ำตาลซูโครส) ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมัน จากการทดลอง พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้ทั้งหมดที่พบในเชื้อรา *C. militaris*, *C. pruinosa* และ *P. tenuipes* มีค่าเท่ากับ 29.23, 8.61 และ 24.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่พบในเชื้อรา *C. militaris*, *C. pruinosa* และ *P. tenuipes* มีค่าเท่ากับ 14.09, 34.60 และ 17.09 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบปริมาณกรดโอลิอิกในกรดไขมันที่มีค่าสูงกว่ามาก 30% ในทั้งสามสายพันธุ์
Huang et al.	2009	ได้วิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีนในเห็ดตระกูลถั่งเช่า พบว่า ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์มีค่าเท่ากับ 2.64 ± 0.02 และ 2.45 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนในเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่ได้จากธรรมชาติมีค่าเท่ากับ 0.980 ± 0.01 และ 1.643 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองมีค่าเท่ากับ 0.904 ± 0.02 และ 1.592 ± 0.03 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ นั่นแสดงให้เห็นว่าสารอะดีโนซีนที่พบในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีค่ามากกว่าที่พบในเส้นใยของดอกเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่ได้จากธรรมชาติ
Bhandari et al.	2010	ได้รายงานว่า เห็ดถั่งเช่าทิเบตอุดมไปด้วยสารสำคัญหลายชนิดที่มีผลทางชีวภาพ เช่น โมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์

ตาราง 1 (ต่อ)

ผู้วิจัย	ปี	สาระสำคัญของงานวิจัย
		(เบต้า-กลูแคน) แมนนิทอล กาแล็กโทส อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน กรดคอร์เซปิก กรดอะมิโน โปรตีน สเตอรอล วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก คอปเปอร์ แมงกานีส และสังกะสี
Das et al.	2010	ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการรักษาโรค พบว่า มีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น เสริมสมรรถนะทางเพศ ต้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ/ชะลอความชรา ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก เพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ต้านการเกิดเส้นใยพังผืด ลดไขมันในเส้นเลือด ขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย ป้องกันโรคเบาหวาน ต้านเชื้อเอดส์ ต้านโรคมาลาเรีย ลดอาการเหนื่อยล้า ป้องกันเซลล์ประสาท ป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ ไต และปอด เป็นต้น
Lim et al.	2012	ได้ทดสอบเกี่ยวกับปริมาณการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า สารอะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน และดี-แมนนิทอล มีคุณสมบัติช่วยแก้ความผิดปกติทางเพศทั้งในผู้ชายและผู้หญิงได้

4. วิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ธัญญา ทะพิงค์แก (2555ข, น. 39) ได้สรุปวิธีการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองว่าสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ 2 แบบ ใหญ่ๆ คือ การเพาะในตัวหนอน หรือดักแด้ หรือแมลงบางชนิด และการเพาะเลี้ยงในอาหารอาหารเทียมหรืออาหารสังเคราะห์

4.1 การเพาะในตัวหนอน หรือดักแด้ หรือแมลงบางชนิด

. การเพาะเลี้ยงวิธีนี้เป็นวิธีที่เลียนแบบธรรมชาติ โดยทำการใส่เชื้อราเห็ดถั่งเช่าที่ได้จากการเตรียมหัวเชื้อลงไปในตัวหนอนสกุล *Thaitarodes* (Hepialus) โดยที่หนอนนั้นยังมีชีวิตอยู่ด้วยวิธีการสเปรย์ หรือการฉีดด้วยเข็มฉีด หรือวิธีการอื่นๆ ที่จะทำให้หนอนติดเชื้อได้ เมื่อหนอนได้รับเชื้อจะค่อยๆ อ่อนแอและตายในที่สุด เห็ดจะงอกออกมาจากตัวหนอน หนอนที่ใช้เพาะเลี้ยง

อาจเก็บมาจากธรรมชาติ โดยเก็บรังไหมมาแล้วทำการเพาะจนได้ดักแด้ก็ได้ สำหรับบ้านเราอาจใช้หนอนไหมหรือหนอนรถด่วนแทนก็ได้ การเพาะในตัวหนอนมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมหัวเชื้อในอาหารวุ้นพีดีเอ วิธีนี้เป็นการต่อเชื้อจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองลงบนอาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ดังนั้นจึงต้องเตรียมอาหารอาหารวุ้น PDA ตามขั้นตอนดังนี้

ส่วนผสมของอาหารวุ้น PDA ประกอบด้วย

- มันฝรั่ง	200 กรัม
- ข้าวโพดอ่อน	50 กรัม
- กลูโคส	20 กรัม
- ยีสต์สกัด	5 กรัม
- เปปโตน	5 กรัม
- วิตามิน B1	200 มิลลิกรัม
- ผงวุ้นบริสุทธิ์	15 กรัม

วิธีทำ

1.1 ชั่งกลูโคส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม ผงวุ้นบริสุทธิ์ 15 กรัม และวิตามิน B1 200 มิลลิกรัม (บดละเอียด) ผสมรวมกัน

1.2 ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม แล้วหั่นเป็นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม นำไปต้มจนสุกกับน้ำสะอาดประมาณ 1,000 มิลลิลิตร กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่งไปเทผสมกับส่วนผสมที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ตั้งไฟอ่อนๆ แล้วเคี่ยวจนส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำสะอาด แล้วปรับค่า pH ของอาหารที่ 6.6-7

1.3 กรอกลงในขวดรูปชมพู่ (flask) หรือขวดโซดาประมาณ 350 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลีแล้วใช้ถุงพลาสติกมัดหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

1.4 เทใส่จานเพาะเชื้อ (glass petri dish) หรือขวดแบนที่ปลอดเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตรต่อจานเพาะ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัว จากนั้นจึงเริ่มต่อเชื้อจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองลงบนอาหารวุ้น PDA โดยเลือกดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สมบูรณ์แช่ในสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% เป็นเวลา 10 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นวางดอกเห็ดลงในภาชนะที่สะอาดปลอดเชื้อ แล้วใช้มีดผ่าตัดตามขวางให้เป็นแผ่นบางๆ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟ แล้วจิกชิ้นของดอกเห็ดที่ผ่าเป็น

แผ่นบางๆ วางลงในจานเพาะที่มีอาหาร PDA นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 22-24 °C เป็นเวลาประมาณ 14-21 วัน จะได้เส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA

2. การขยายหัวเชื้อในอาหารเหลวพีดีบี

วิธีนี้เป็นการขยายหัวเชื้อของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารวุ้น PDA ลงในอาหารเหลวพีดีบี (potato dextrose broth; PDB) ดังนั้นจะต้องเตรียมอาหารเหลว PDB ตามวิธีการดังนี้

2.1 เตรียมส่วนผสมเหมือนกันกับวิธีการทำอาหารวุ้น PDA ยกเว้นวุ้นบริสุทธิ์ (ไม่ต้องใส่)

2.2 ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม แล้วหั่นเป็นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม นำไปต้มจนสุกกับน้ำสะอาดประมาณ 1,000 มิลลิลิตร กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่งไปเทผสมกับส่วนผสมที่เตรียมไว้ ตั้งไฟอ่อนๆ เคี่ยวจนส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำสะอาด แล้วปรับค่า pH ของอาหารที่ 6.6-7

2.3 กรอกลงในขวดรูปชมพู่หรือขวดโซดาขวดละ 350-400 มิลลิลิตร ปิดฝาหรืออุดด้วยจุกสำลีแล้วใช้ถุงพลาสติกมัดหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นทำการขยายเชื้อเห็ดในอาหารเหลว PDB โดยใช้คอร์กบอยเลอร์เจาะวุ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ หรือใช้มีดฝ่าตัดลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่ให้เป็นสี่เหลี่ยม กว้าง × ยาว ประมาณ 1×1 เซนติเมตร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยลนไฟแล้วจิกชิ้นวุ้นลงในอาหารอาหาร PDB นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 22-24 °C เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน จะได้เส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDB

3. การถ่ายหัวเชื้อจากอาหารเหลว PDB ลงในตัวหนอน

วิธีการนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองให้เกิดดอก โดยสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในขวดปลอดเชื้อ และกระบะในโรงเรือน

3.1 การเพาะในขวดแก้ว (สภาพปลอดเชื้อ) ต้องทำในห้องปฏิบัติการ และตู้เขี่ยเชื้อที่สะอาด อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยมากจะใช้ดักแด้ที่ผ่าออกมาจากรังไหม โดยนำดักแด้มาเช็ดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ก่อน เพื่อทำความสะอาด เพราะดักแด้ที่อยู่ในรังไหมค่อนข้างสะอาดอยู่แล้ว ทำการใส่เชื้อเห็ดลงในตัวดักแด้ในตู้เขี่ยเชื้อ โดยวิธีป้าย สเปรย์ ฉีด หรือกรีดให้เป็นแผลแล้วใส่เชื้อเห็ดลงไปในตัวดักแด้ จากนั้นใส่ลงในขวดแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาให้สนิท นำไป

เพาะเลี้ยงต่อไป ช่วงแรกหลังจากใส่เชื้อให้นำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน จากนั้นจึงให้แสงสว่าง

3.2 เพาะในกระบะ (โรงเรือน) ทำการเลี้ยงหนอนไหม (*Bombyx mori*) ในกระบะในโรงเรือนแบบปิดที่สะอาด และสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในได้ โดยทำการสเปรย์หัวเชื้อเห็ดลงบนตัวหนอนที่เพิ่งลอกคราบระยะที่ 5 (ช่วงลอกคราบหนอนจะอ่อนแอที่สุด) โดยจะทำการสเปรย์ 3 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ทำการให้อาหารหนอนด้วยใบไม้ไปจนกระทั่งเข้าดักแด้ หลังจากเข้าดักแด้เป็นเวลา 11 วัน ให้ทำการผ่าตัดรังไหมเอาดักแด้ที่ติดเชื้อออกมา (ดังภาพ 17) นำไปบ่มบนกระบะเพาะที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 20-22 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 95% ในที่มืดเพื่อให้เชื้อพัฒนาเป็นดอกเห็ด มีการให้น้ำเป็นระยะเพื่อป้องกันไม่ให้แห้งเกินไป วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเพาะเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ประเทศเกาหลี มีการปรับปรุงพันธุ์หนอนไหมให้เหมาะแก่การเพาะเห็ดถั่งเช่าโดยเฉพาะ

มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในตัวหนอน ดักแด้หรือแมลง ตัวอย่างเช่น

Hong et al. (2010, pp. 128-132) ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ในตัวหนอนไหม *(B. mori)* 3 สายพันธุ์คือ Daeseungjam Baegokjam และ Keumokjam โดยศึกษาวิธีการที่แตกต่างกันที่จะทำให้เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองเข้าก่อโรคในตัวหนอนไหม และสภาวะที่ชักนำให้เกิดดอก พบว่า เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองมีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อโรคกับดักแด้ไหมพันธุ์ Daeseungjam ได้ดีที่สุด 90.8% โดยช่วงอายุที่เหมาะสมของหนอนไหมที่ติดเชื้อได้ดีที่สุดคือหลังจากที่ลอกคราบไปแล้ว 9-11 วัน กรรมวิธีการฉีดสารแขวนลอยเชื้อราเห็ดถั่งเช่า (hyphal bodies) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 2×10^5 cfu ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร บริเวณทรวงอกของตัวหนอนไหมเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้หนอนไหมติดเชื้อ และความเข้มแสงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดดอกคือ 500 และ 1,000 ลักซ์

วราภรณ์ สุทธิสา (2556, น. 492-497) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Cordyceps* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ mushroom complete agar (MCM) หลังจากปลูกเชื้อ 21 วัน พบว่าเชื้อเจริญช้ามาก แต่บนอาหาร PDA เชื้อสามารถสร้าง pigment ได้มากกว่าบนอาหาร MCM การฉีดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Cordyceps* sp. ที่ความเข้มข้น 108 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้กับดักแด้ไหมและหนอนไหม พบว่าเชื้อสามารถเจริญบนดักแด้ไหมได้ดีกว่าบนหนอนไหม การศึกษาการเจริญของเชื้อบนอาหารกึ่งสังเคราะห์ผสมกับโปรตีนจากดักแด้ไหมหรือหนอนไหม พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ 21 วัน การเจริญของเชื้อไม่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดอาหาร และแหล่งโปรตีน

การศึกษาการเจริญของเชื้อบนวัสดุธรรมชาติผสมกับโปรตีนจากดักแด้ไหมและหนอนไหม พบว่า หลังจากการปลูกเชื้อ 21 วัน การเจริญของเชื้อในทุกกรรมวิธีที่มีการเติมโปรตีนจากดักแด้ไหมและหนอนไหมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นการเลี้ยงเชื้อบนกิ่งหม่อนบดผสมรำข้าวผสมโปรตีนจากดักแด้ไหม 5% กิ่งหม่อนบดผสมรำข้าวผสมโปรตีนจากหนอนไหม 5 และ 10% ที่มีการเจริญน้อยกว่าในกรรมวิธีอื่น ไม่พบการพัฒนาเป็นสโตรมาในทุกกรรมวิธี

กนกวรรณ ลือดารา และคณะ (2559, น. 95-102) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยและดอกเห็ดของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ในดักแด้ไหมไทยพื้นบ้านพันธุ์นางลาย (*B. mori*) และไหมป่าอีรี่ (*Samia ricini*) ทำการทดสอบกับเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ CMRU-1 และ CM Saraburi โดยทำการทดลอง 3 กรรมวิธี คือ การฉีด การจุ่ม และการทำให้เป็นแผลแล้วจุ่มดักแด้ในเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีการฉีดสารแขวนลอยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU-1 เข้าตัวดักแด้เป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด มีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อโรคกับดักแด้ไหมพันธุ์นางลายสูงสุด 72.50% มีการเจริญของดอกเห็ดสูงสุด 85.50% และดอกเห็ดมีน้ำหนักสด 42.70 กรัม ในขณะที่เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM Saraburi มีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อโรคกับดักแด้ไหมพันธุ์นางลาย 53% และมีการเจริญของดอกเห็ด 88.70% นอกจากนี้เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM Saraburi มีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อโรคกับดักแด้ไหมป่าอีรี่ 26% มีการเจริญของดอกเห็ด 94.20% และน้ำหนักสดดอกเห็ดอยู่ที่ 24.13 กรัม ในส่วนของการศึกษาสารออกฤทธิ์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนดักแด้ไหมพบความแตกต่างของสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนระหว่างส่วนดอกเห็ดและตัวดักแด้ โดยพบความเข้มข้นของสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM Saraburi บนดักแด้ไหมป่าอีรี่สูงสุด 445.65 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในขณะที่ตัวดักแด้พบ 306.41 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ที่พบความเข้มข้นของคอร์ไดเซปิน รองลงมาคือ CMRU-1 ที่ตัวดักแด้ไหมพันธุ์นางลายพบ 233.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในส่วนของความเข้มข้นอะดีโนซีน พบส่วนดอกเห็ดของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU-1 ที่ขึ้นบนตัวดักแด้ไหมป่าอีรี่ มีความเข้มข้นของอะดีโนซีนสูงสุด 13.79 มิลลิกรัมต่อ100กรัม ส่วนความเข้มข้นของอะดีโนซีนรองลงมา คือ สายพันธุ์ CM Saraburi ในดอกเห็ดที่ขึ้นบนตัวดักแด้ไหมป่าอีรี่ 5.93 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

รัฐพล ศรประเสริฐ และคณะ (2559, น. 239-251) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ในสูตรอาหารแมลง 4 ชนิด ได้แก่ ดักแด้ไหม กระชอน จิ้งหรีด และตั๊กแตนปาทังก้า โดยแบ่งแมลง เป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 เพาะในแมลงแต่ละชนิดในขวดเพาะเลี้ยงในปริมาณ 50 กรัมต่อขวดที่ปลอดเชื้อ จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร และชุดที่ 2 เพาะในแมลงแต่ละชนิดในขวดเพาะเลี้ยงปริมาณ 50 กรัมต่อขวด จากนั้นนำอาหารเสริม (กลูโคส 15 กรัม เปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม ไดไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม และไทมีน 0.5 กรัม ผสมลงในน้ำต้มมันฝรั่ง 1,000 มิลลิลิตร) 15 มิลลิลิตร และผงวุ้น 15 กรัม จะได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 4 สูตร จากการทดลอง พบว่า สูตรแมงกระชอนผสมอาหารเสริมเป็นสูตรที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญและให้ผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมากกว่าสูตรอื่นๆ โดยมีปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินเท่ากับ 156.73 และ 208.17 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

4.2 **การเพาะด้วยอาหารเทียมหรืออาหารสังเคราะห์**

เห็ดถั่งเช่าแต่ละชนิดต้องการอาหารที่ไม่เหมือนกัน แต่สามารถเจริญบนอาหารสูตรพื้นฐานได้ ส่วนการที่จะเจริญเติบโตให้ผลผลิตดีนั้น ควรเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อเห็ดชนิดนั้นๆ อาหารที่ใช้เพาะเชื้อเห็ดนั้นอาจเป็นอาหารวิทยาศาสตร์ ได้มาจากการผสมสารเคมีหลายๆ ชนิด หรืออาจเป็นวัตถุดิบตามธรรมชาติก็ได้ วัตถุดิบแต่ละชนิดที่นำมาทำอาหารมีคุณค่าทางสารอาหารต่างกัน สามารถแบ่งตามลักษณะของอาหารได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ

1. อาหารแข็ง อาจเป็นอาหารวุ้น หรือเมล็ดธัญพืชก็ได้ เช่น ข้าวสังข์หยด ข้าวฟ่าง ข้าวขาว ข้าวกล้อง ถั่ว เมล็ดข้าวโพด ข้าวสาลี เป็นต้น นำมาดัดแปลงเป็นสูตรอาหารชนิดต่างๆ ตามความเหมาะสม โดยจะนำหัวเชื้อเห็ดมาวางบนอาหาร แล้วนำไปบ่มที่ 20-25 °C ประมาณ 30-45 วัน โดยใน 2 สัปดาห์แรกจะบ่มในที่มืดเพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มอาหาร หลังจากนั้นให้ได้รับแสงประมาณ 14-16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มของแสง 1,000-3,000 ลักซ์ เพื่อให้ดอกเห็ดเจริญ ตัวอย่างสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยธัญพืชข้าว ประกอบด้วยวัตถุดิบที่สำคัญ ดังนี้

ธัญพืช เช่น ข้าวขาวเสาไห้	50 กรัม
ดักแด้ไหม	30 กรัม
มันฝรั่ง	200 กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50 กรัม
ดีเกลือ	0.5 กรัม
เปปโตน	5 กรัม
ยีสต์สกัด	5 กรัม

กลูโคส	20 กรัม
วิตามิน B1	200 มิลลิกรัม

วิธีทำ

1.1 เตรียมอาหารเหลว PDB โดยชั่งกลูโคส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม ดีเกลือ 0.5 กรัม และวิตามิน B1 200 มิลลิกรัม (บดละเอียด) ผสมรวมกัน

1.2 ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม แล้วหั่นเป็นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม นำไปต้มจนสุกกับน้ำสะอาดประมาณ 1,000 มิลลิลิตร กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่งไปเทผสมกับส่วนผสมที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ตั้งไฟอ่อนๆ แล้วเคี่ยวจนส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำสะอาด จากนั้นปั่นดักแด้ไหมกับอาหารเหลว PDB ที่เตรียมได้ด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ และปรับค่า pH ของอาหารที่ 6.6-7 จะได้อาหารเหลวสูตรดัดแปลง

1.3 ผสมข้าวและอาหารเหลวสูตรดัดแปลงลงในขวดเพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมเป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยตวงข้าว 50 กรัม และอาหาร PDB ลงในขวดเพาะเลี้ยง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น แล้วหยอดเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB ลงไปประมาณ 3-5 มิลลิลิตร

1.4 นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22-24 °C ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 70% จนเส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะ จากนั้นกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกโดยลดอุณหภูมิในห้องเพาะเลี้ยงลงที่ 18 °C ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 80% ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเกิดตุ่มดอกแล้วให้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 22-24 °C เหมือนเดิม ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 80-90% ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงจนกระทั่งดอกสมบูรณ์โดยใช้เวลา 60-65 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยว

มีรายงานที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารสังเคราะห์ที่เป็นเมล็ดธัญพืช ตัวอย่างเช่น Kim et al. (2010, pp. 133-136) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า *C. cardinalis* ในเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าบนข้าวกล้อง ข้าวฟ่างเยอรมัน และข้าวฟ่างทั่วไป จะทำให้ดอกเห็ดมีความยาวมากที่สุด รองลงมาคือข้าวบาร์เลย์จีน ข้าวฟ่างอินเดีย ข้าวดำ และข้าวบาร์เลย์ทั่วไป ตามลำดับ ส่วนข้าวโอ๊ตบดทำให้ดอกเห็ดสั้น มากที่สุด และเมื่อเติมดักแด้ไหมหรือตัวหนอนไหมร่วมกับเมล็ดธัญพืชจะทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น และพบว่าดักแด้ไหมจะให้ผลผลิตดีกว่าตัวหนอนไหม โดยสูตรอาหารที่ประกอบด้วยข้าวกล้องประมาณ

50-60 กรัม ดักแด้ไหมประมาณ 10-20 กรัม ผสมกับน้ำสะอาด 50-60 มิลลิลิตร เป็นสูตรที่ทำให้ได้ผลผลิตดีที่สุด

ธัญญา ทะพิงค์แก และคณะ (2557, น. 28) ได้ศึกษาการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU (*C. militaris* CMRU strain) ในอาหารที่เป็นเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ จำนวน 10 ชนิด คือ ข้าวขาว ข้าวซ้อมมือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วแดง ถั่วเหลือง และถั่วเขียว โดยใช้ธัญพืชแต่ละชนิด 80 กรัมต่อกระบะ ผสมกับสารละลาย ประกอบด้วย น้ำต้มมันฝรั่ง (200 กรัม) 1,000 มิลลิลิตร กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร ดีเกลือ 0.5 กรัมต่อลิตร ปุ๋ยสูตร 0-52-34 ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ผงดักแด้ไหม 30 กรัมต่อลิตร วิตามินบี 1 ปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ข้าวขาว ข้าวซ้อมมือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวบาร์เลย์ และลูกเดือย เหมาะสมเป็นแหล่งให้คาร์บอนแก่เชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยธัญพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ ให้น้ำหนักเห็ดสด น้ำหนักเห็ดแห้ง และปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมา ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วแดง และข้าวสาลีตามลำดับ นอกจากนี้ ธัญญา ทะพิงค์แก (2556) รายงานว่า การเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยข้าวกล้อง ข้าวขาว ข้าวสังข์หยด ข้าวน้ำนม ข้าวหอมมะลินิล และข้าวฟ่าง ให้น้ำหนักเห็ดสดและแห้ง รวมทั้งปริมาณคอร์ไดเซปินไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เพาะด้วยข้าวมันปูและข้าวเหลืองเก่า ให้ผลผลิตและปริมาณคอร์ไดเซปินที่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

Gregori (2014, pp. 45-52) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) 5 สายพันธุ์ บนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยสูตรอาหารประกอบด้วยข้าวไรย์ผสมกับกากมอลท์ที่ใช้ผลิตเบียร์ (spent brewery grains, SBG) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0-60% พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM2 จากประเทศจีนที่พาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบด้วย SBG ความเข้มข้น 0% 10% 20% 30% 40% และ 50% และสายพันธุ์ CM5 จากประเทศสโลเวเนียที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ประกอบด้วย SBG 10% 20% 30% 40% และ 50% สามารถเจริญและพัฒนาเป็นดอกหรือสโตรมาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ CM2 บนอาหาร SBG ที่ความเข้มข้น 50% จะให้ปริมาณคอร์ไดเซปินในอาหารเพาะ (cordycepin content in substrate, CCS) สูงสุด คือ 10.42 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนสายพันธุ์ CM11 จากประเทศจีน พบปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเส้นใย (fungal biomass cordycepin production, FBCP) สูงสุดคือ 787.11 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี SBG ความเข้มข้น 0%

รัฐพล ศรประเสริฐ และคณะ (2559, pp. 239-251) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวมันปู่ เมล็ดข้าวสังข์หยด เมล็ดข้าวหอมนิล เมล็ดข้าวสาลี และเมล็ดเดือย ที่ผ่านการแช่น้ำสะอาด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำเมล็ดธัญพืชแต่ละชนิดจำนวน 20 กรัมผสมอาหารเสริม (กลูโคส 15 กรัม เปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม ไดไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม และไทอะมีน 0.5 กรัม ผสมลงในน้ำต้มมันฝรั่ง 1,000 มิลลิลิตร) พบว่า สูตรอาหารที่เป็นเมล็ดข้าวหอมนิลมีความเหมาะสมมากที่สุด (6.08 กรัม) รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวมันปู่ สูตรเมล็ดข้าวสาลี สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด และสูตรเมล็ดเดือย ตามลำดับ

2. อาหารเหลว โดยปกติในการเพาะอาหารเหลวผลผลิตเห็ดถั่งเช่าจะเป็นเส้นใย การเพาะด้วยอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้เทคนิคพิเศษในการเพาะเลี้ยง เช่น การเลี้ยงแบบแช่ในอาหาร (submerged culture) และเขย่า (shaking) การเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว (surface liquid culture) และการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เทคนิคการเลี้ยงแบบเขย่าทำได้โดยตัดหัวเชื้อเห็ดที่ขึ้นบนอาหารวุ้นด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 5 ตารางมิลลิเมตร นำไปใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 หรือ 500 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลวบรรจุอยู่ 50-100 มิลลิลิตร นำไปปมที่อุณหภูมิ 20-25 °C โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 50-150 รอบต่อนาที ประมาณ 5-7 วัน จากนั้นจึงนำเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้มาใช้ประโยชน์ Shih, Tsai and Hsieh (2007, pp. 193-197) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris* CCRC 32219) ได้แก่ ค่า pH ของอาหาร แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ (เปปโตน ยีสต์สกัด แป้งข้าวโพด) ชนิดของน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันมะกอก) และวิธีการเพาะเลี้ยง (แบบเขย่า และแบบตั้งอยู่กับที่) ต่อการเจริญของเส้นใยและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารเอ็กโซพอลีแซ็กคาร์ไรด์ (exopolysaccharide; EPS) อะดีโนซีน และคอร์ไดเซปิน จากการทดลองพบว่า ค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่าประมาณ 4 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย การผลิตสาร EPS และสารคอร์ไดเซปิน แหล่งไนโตรเจนที่เป็นยีสต์สกัดมีความเหมาะสมต่อการผลิตสาร EPS และสารคอร์ไดเซปิน ในขณะที่แป้งข้าวโพดเหมาะสมต่อการผลิตสารอะดีโนซีน ส่วนการทดสอบหาชนิดของน้ำมันพืชที่เหมาะสมที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า น้ำมันพืชทุกชนิดสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสาร EPS ได้ แต่ไม่มีผลมากนักต่อการผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน และในส่วนวิธีการเพาะเลี้ยง พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบเขย่าร่วมกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าโดยตั้งทิ้งไว้ เป็นวิธีที่ทำให้เส้นใยมีการผลิตสารคอร์ไดเซปินเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด (1,103 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อศึกษาสภาวะของสูตรอาหารโดยวิธี Box–Behnken

experimental design เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารคอร์ไดเซปินโดยการคำนวณจากสมการ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารคือ อาหารเพาะเลี้ยงมีค่า pH เท่ากับ 6 ยีสต์สกัดปริมาณ 45 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าเป็นเวลา 8 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่าโดยตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 16 วัน จะทำให้ได้ปริมาณคอร์ไดเซปินสูงสุด (2,214.5 มิลลิกรัมต่อลิตร)

5. การเก็บเกี่ยวผลผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นระยะเวลาประมาณ 60-65 วัน หลังจากหยอดเชื้อ ดอกเห็ดจะเจริญเติบโตเต็มที่ ให้ทำการเก็บเกี่ยวโดยใช้แอลกอฮอล์ 70% ฉีดพ่นบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยวรวมถึงอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง จากนั้นเปิดฝาขวดและแคะผลผลิตออกมาทั้งชิ้นจากขวดแล้ววางบนภาชนะที่สะอาด ใช้มือดึงก้านเห็ดถั่งเช่าสีทองออกมาจากอาหารเพาะให้ถึงโคนต้นหรืออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ด้วยความระมัดระวัง ลักษณะของดอกเห็ดที่สมบูรณ์จะมีลักษณะดอกอวบและยาว มีสีเหลืองส้ม และไม่มีราปนเปื้อน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิคการเพาะเลี้ยงของแต่ละฟาร์ม หากขวดเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ไม่ควรเก็บดอกเห็ดในขวดนั้น ให้นำขวดที่มีการปนเปื้อนไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนล้างทำความสะอาดตามปกติ

6. กระบวนการควบคุมให้เห็ดถั่งเช่าสีทองออกดอก

ธัญญา ทะพิงค์แก (2555ข, น. 61) ได้อธิบายกระบวนการควบคุมให้เห็ดถั่งเช่าสีทองออกดอกไว้ 4 ขั้นตอน ดังนี้

6.1 ให้แสงอย่างน้อยวันละไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง โดยทั่วไปจะให้แสง 12-14 ชั่วโมง ช่วงแสงกลางวันได้จากแสงธรรมชาติ ช่วงกลางคืนได้จากหลอดเรืองแสง

6.2 ให้อุณหภูมิช่วงกลางวันระหว่าง 20-22 °C กลางคืนระหว่าง 15-17 °C

6.3 ควบคุมความชื้นสมพัทธ์ให้อยู่ที่ประมาณ 65%

6.4 อัตราการถ่ายเทอากาศในช่วงนี้จะไม่มาก เปิดให้วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที หลังจากทำได้ 3-5 วัน เส้นใยเห็ดก็จะเปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีส้ม ในอีก 6-8 วัน ผิวเส้นใยเห็ดจะขับหยดสีเหลืองออกมาเป็นรอยด่างหลายๆ ขนาด บนผิววัสดุเพาะ แล้วเจริญเป็นตุ่มดอกสีส้มผุดขึ้นมา

7. ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารสำคัญทางชีวภาพ มีดังนี้

7.1 สายพันธุ์ ความแข็งแรงของแม่พันธุ์หรือเชื้อเห็ดมีผลต่อการสร้างของดอกเห็ด แม่พันธุ์ที่อ่อนหรือแก่จนเกินไปจะทำให้การเกิดดอกไม่มีคุณภาพ เช่น เส้นใยเดินช้า จำนวนดอกน้อย ดอกสั้นจนเกินไป และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อย เป็นต้น เชื้อเห็ดอาจได้มาจากแหล่งเก็บรักษา

พันธุ์จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น หน่วยเก็บรักษาพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (DOA) ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) หน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์เฉพาะทางของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ (BCC) เป็นต้น

7.2 อาหารเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่ามีมากมายหลายสูตร ส่วนประกอบหลักในอาหารเพาะเห็ดถั่งเช่า ประกอบด้วย (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 49)

7.2.1 แหล่งให้คาร์บอน (carbon source) เป็นแหล่งที่ให้พลังงาน พบในวัตถุดิบที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ Lim et al. (2012, pp. 181-187) รายงานว่าการใช้เมล็ดข้าวฟ่างเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองจะทำให้ได้ปริมาณสารอะดีโนซีน และดี-แมนนิทอลสูง แต่ในช่วงสัปดาห์แรกจะต้องเลี้ยงในที่มืด หากต้องการอะนิโนซีนสูงจะทำการเก็บผลผลิตได้หลังการเพาะไปได้ 40 วัน แต่ถ้าหากต้องการดี-แมนนิทอลสูงจะต้องเก็บวันที่ 50 แต่ถ้าหากต้องการคอร์ไดเซปินสูงควรเพาะด้วยเมล็ดถั่วเหลือง โดยช่วงสัปดาห์แรกจะเลี้ยงในที่มืดและจะทำการเก็บผลผลิตได้หลังการเพาะไปได้ 50 วัน ในช่วงหลังการเพาะไปได้ 40-50 วัน ปริมาณอะดีโนซีนจะลดลง แต่คอร์ไดเซปินจะเพิ่มขึ้น

7.2.2 แหล่งให้ไนโตรเจน (nitrogen source) พบในวัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีน ได้แก่ ยีสต์สกัด (yeast extract) เปปโตน (peptone) เนื้อสกัด ไข่ ผงดักแด้ไหม มันฝรั่งสด เป็นต้น Masuda et al. (2006, pp. 641-646) รายงานว่าการใช้ยีสต์สกัด เพปโตน และกรดคาซามิโน (casamino acid) เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน สูงสุด 640 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงที่สุดตั้งแต่เคยมีการศึกษามา

7.2.3 บัฟเฟอร์ (buffer) เป็นสารที่ใช้ปรับความเป็นกรดเป็นเบส หรือค่า pH ในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีความเหมาะสม ได้แก่ ปุ๋ยเคมีสูตร 0-52-34 (monopotassium phosphate) กรดมะนาว (citric acid) Shih, Tsai, & Hsieh (2007, pp. 193-197) รายงานการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า ค่า pH ที่ต่ำ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใย การผลิต exopolysachharide (ESP) และการผลิตสารคอร์ไดเซปิน ซึ่งยีสต์สกัดจะเป็นแหล่งสำคัญต่อการผลิตสาร EPS และสารคอร์ไดเซปิน และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีแบบเขย่าที่จะทำให้มีเห็ดถั่งเช่าสีทองมีการผลิตสารคอร์ไดเซปินเพิ่มขึ้น

7.2.4 ดีเกลือ (magnesium sulphate) หรืออาจเติมพวกเกลือโซเดียมของซีลีไนท์หรือซีลีเนท (sodium selenite) Dong et al. (2012, pp. 2030-2036) รายงานว่า การใส่สารโซเดียมของซีลีไนท์ความเข้มข้น 18 ppm ลงไปในวัสดุเพาะที่เป็นข้าวสาลี จะช่วยทำให้กิจกรรมของเอนม์ SOD ปริมาณของคอร์ไดเซปิน กรดคอร์เซปิก อะดีโนซีน คอร์ไดเซฟโพลีแซ็กคาร์ไรด์ และกรดอะมิโนรวมเพิ่มขึ้น 121 ต่อ 145%, 124 ต่อ 74%, 325 ต่อ 520% 130 ต่อ 248% 121 ต่อ 145% และ 157 ต่อ 554% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวัสดุเพาะที่ไม่ได้ใส่สารนี้

7.2.5 วิตามิน (vitamin) ใช้วิตามินบี 1 (thiamine chloride) เพื่อส่งเสริมการเจริญให้ได้ผลผลิตที่มากขึ้น

สูตรอาหารที่มีสารอาหารมาก (rich media) เช่น Czapek Yeast Extract Agar (CZYA), Sabouraud Maltrose agar plus Yeast Extract (SMAY), Sabouraud Dextrose agar plus Yeast Extract (SYDA) จะส่งเสริมในการสร้างเม็ดสี (pigmentation) ของดอกเห็ดถั่งเช่ามากขึ้น ทำให้สีสด สวยงาม ก่อนที่จะนำเชื้อเห็ดเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะจะต้องนำอาหารเพาะมานึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง เสียก่อน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นๆ นอกจากวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ยังสามารถใช้สารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แทนการนึ่งฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากสารชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้สูง จากการทดลองพบว่าสามารถลดขั้นตอนที่ซับซ้อน ลดต้นทุน และสามารถทำตามได้ง่ายโดยใช้อุปกรณ์ที่หาได้ตามท้องถิ่น (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555a, น. 55)

7.3 อุณหภูมิ เห็ดถั่งเช่าชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเส้นใยและเกิดดอกอยู่ระหว่าง 22-25 °C ในช่วงก่อนเปิดดอกจะนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15-18 °C เพื่อกระตุ้นให้เกิดปุ่มตาดอก จากนั้นจึงนำไปเปิดดอกที่อุณหภูมิ 22-25 °C เหมือนเดิม Hung et al. (2009, pp. 219-225) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปิน พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารคอร์ไดเซปินอยู่ที่ 15-20 °C และ 25 °C ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 30 °C การเจริญเติบโตของเส้นใยและการผลิตสารคอร์ไดเซปินจะหยุดลง

7.4 ความชื้น เห็ดถั่งเช่าจะเจริญได้ดีในบริเวณที่มีความชื้นสัมพัทธ์เหมาะสม ถ้าเป็นช่วงระยะเวลาที่อยู่ในระหว่างการบ่มเพื่อให้เส้นใยเจริญความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม คือ อยู่ระหว่าง 60-70% แต่ถ้าเป็นช่วงระยะเวลาที่มีการเจริญพัฒนาเป็นดอกเห็ดความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม คือ อยู่ระหว่าง 80-90%

7.5 แสงสว่าง แสงสว่างเป็นปัจจัยสำคัญเนื่องจากมีผลต่อความหนาแน่น (density) เนื้อ (texture) และการเกิดสี (pigmentation) ของเส้นใยเห็ดที่เพาะ (Shrestha et al., 2006, pp. 228-236) ในช่วงที่มีการกระตุ้นให้เกิดปุ่มตาของดอกความความเข้มข้นแสงที่เหมาะสมจะอยู่ที่ 500 ลักซ์ เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อปุ่มดอกเห็ดเจริญเป็นดอกที่สมบูรณ์แล้วจะเพิ่มความเข้มของแสงเป็น 600-1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมงต่อวัน Dong et al. (2012, pp. 2030-2036) ได้ศึกษาสีของแสงว่ามีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างไร จากการทดลอง พบว่า สีของแสงมีผลต่อปริมาณคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน และการเจริญของเส้นใย เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะในอาหารเหลวภายใต้สภาพแสงสีน้ำเงินจะมีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงกว่าที่เลี้ยงภายใต้แสงสีชมพู และที่เพาะภายใต้แสงสีชมพูจะมีปริมาณคอร์ไดเซปินสูงกว่าที่เพาะในแสงปกติ แสงสีแดง และที่มืด เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะภายใต้แสงสีแดงมีปริมาณอะดีโนซีนสูงกว่าที่เพาะภายใต้แสงสีชมพู ที่มืด แสงปกติ และแสงสีนน้ำเงิน ด้านการเจริญของเส้นใยพบว่า แสงสีแดงส่งเสริมการเจริญดีกว่าแสงสีชมพู ที่มืด และแสงปกติ ส่วนแสงสีน้ำเงินให้ผลการเจริญของเส้นใยต่ำสุด

8. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดถั่งเช่า

ดอก หรือ ฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting body) หรือ สโตรมา (stroma) ของเห็ดถั่งเช่าสามารถสร้างได้จากทั้งสปอร์และเนื้อเยื่อ กล่าวคือ การสร้างฟรุตติ้งบอดี้จากสปอร์นั้นทำได้โดยการใช้วิธีมัลติแอสโคสปอร์ (multi-ascospore) ซึ่งคือการผสมกันของ single-ascospore isolate ที่ได้มาจากฟรุตติ้งบอดี้ที่ต่างกัน การผสมเห็ดถั่งเช่าในรุ่นถัดไปส่งผลให้การผลิตฟรุตติ้งบอดี้เห็ดถั่งเช่ามีปริมาณและขนาดลดลงเรื่อยๆ (Shrestha et al., 2010, pp. 228-236) นอกจากนี้ยัง พบว่า การเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อไปอีกหลายๆ รุ่น (subculture) จะทำให้มีผลผลิตของดอกเห็ดมีทั้งปริมาณและขนาดเล็กลงมาก (Sung et al., 2006, pp. 196-199) เห็ดถั่งเช่าเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตที่เกิดจากการผสมกันของสปอร์ต่างชนิดกันมารวมตัวกัน การเจริญเติบโตเส้นใยในช่วงแรกนี้เป็นเส้นใยที่มี 1 นิวเคลียส (n = primary mycelium) เส้นใยเหล่านี้ที่เกิดจากต่างชนิดกันมารวมกันในช่วงที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งเป็นการผสมพันธุ์กันของสปอร์ต่างชนิดกันและเจริญต่อไปเป็นเส้นใยทุติยภูมิเป็น n+n (secondary mycelium) จากนั้นจึงมีการรวมตัวกันของนิวเคลียสได้เป็น 2n เพื่อพัฒนาเป็นก้อนของเส้นใยรา ซึ่งในขั้นนี้เรียกว่า เส้นใยตติยภูมิ (tertiary mecelium) ซึ่งเกิดจากเส้นใยทุติยภูมิจะรวมตัวกันเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไป การอ่อนแอหรือกลายพันธุ์ (mutation) ของสายพันธุ์จะส่งผลต่อภาคอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าในด้านผลผลิต คุณสมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของดอกเห็ด รวมทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นจึงมีการศึกษาและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่แข็งแรง ออกดอกเร็ว ให้ผลผลิตสูง มีขนาดและสีตรงตามความต้องการของตลาด และให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง โดยแต่ละ

สายพันธุ์ของเห็ดถั่งเช่ามีองค์ประกอบของสารเคมีที่ไม่เหมือนกัน การปรับปรุงสายพันธุ์ทำได้หลายวิธี เช่น การใช้รังสี (radiation) การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion) การใช้สารเคมี และการใช้พิษงู (snake venom hybridization) เป็นต้น (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 66)

8.1 เทคนิคการปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้รังสี เป็นการใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ รังสีที่กระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ

8.1.1 Ionizing Radiation เช่น รังสีเอกซ์, รังสีบีตา, รังสีแกมมา

8.1.2 Non-Ionizing Radiation เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (รังสียูวี) อย่างไรก็ตาม การใช้รังสีต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณรังสีที่เหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์มาก แต่ไม่ถึงขนาดทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นตายหมด ปริมาณรังสีที่ใช้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็แตกต่างกันไป

8.2 การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion) หรือการรวมโปรโตพลาสต์ คือ การนำโปรโตพลาสต์ของเห็ดต่างชนิดหรือจีโนไทป์ มาทำให้เกิดการหลอมรวมกัน เพื่อถ่ายทอดยีนในนิวเคลียสและ/หรือไซโตพลาสซึม สร้างลูกผสมที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างออกไป หรือเรียกว่า somatic hybridization โดยทั่วไปมักใช้เพื่อการผสมข้ามสายพันธุ์สปีชีส์ หรือสกุล ซึ่งมักประสบปัญหาความเข้ากันไม่ได้ของการผสมโดยอาศัยเพศ ในงานวิจัยของ อัมพร ประสิทธิเวช (2556) ได้ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ให้มีปริมาณการผลิตดอกเห็ดและสารคอร์ไดเซปินเพิ่มขึ้น โดยทำการผสมพันธุ์เห็ดชนิดนี้ 3 คู่ผสม คือ คู่แรกระหว่างสายพันธุ์ TY01 และ LY01 คู่ที่สองระหว่างสายพันธุ์ GNL และ LY01 และคู่ที่สามระหว่าง สายพันธุ์ NL และ GNL ด้วยวิธีการรวมตัวของไมซีเลียมเป็นมัลติไมซีเลียม โดยเริ่มจากนำเส้นใย *C. militaris* เจาะตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราอายุ 14 วัน ซึ่งเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อของแต่ละคู่ผสมที่อุณหภูมิ 20-22 °C นำชิ้นส่วนของเส้นใยเฉพาะตรงกลางที่เกิดการรวมตัวของเส้นใยแต่ละคู่ผสมไปเลี้ยงในอาหารเหลวต่อไปอีก 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งเมล็ดธัญพืชข้าวกล้อง ที่อุณหภูมิ 20- 22 °C ในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน และกระตุ้นให้เกิดดอกที่อุณหภูมิ 20 °C ให้รับแสง 1,000 ลักซ์ นาน 8 สัปดาห์ พบว่า คู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ GNL และ GNL มีการเจริญเติบโตให้ผลผลิตน้ำหนักสดของดอกเห็ดมากที่สุด เท่ากับ 3.12 ± 0.721 กรัม ส่วนคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ LY01 และ LY01 และคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ GNL และ LY01 ให้ผลผลิตน้ำหนักสดเท่ากับ 1.75 ± 0.918 และ 1.31 ± 0.506 ตามลำดับ และพบว่า มีการผลิตสารคอร์ไดเซปินในทุกๆ ชุดการทดลอง

8.3 การใช้สารเคมี เช่น สารโคลชิซีน (colchicine) สารนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการแยกตัวของโครโมโซม หรือเส้นสายของสารพันธุกรรมในขั้นตอนการแบ่งเซลล์ การยับยั้งการแยกตัวของโครโมโซมนั้น มีผลให้สารพันธุกรรมที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่กับชุดเดิมไม่แยกจากกัน เซลล์นั้นจึงมีสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ปกติเซลล์เนื้อเยื่อทั่วไปมีโครโมโซม 2 ชุด หรือ 2x เมื่อสารพันธุกรรมเพิ่มเป็น 2 เท่า จะทำให้ได้เนื้อเยื่อที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีโครโมโซม 4x ซึ่งมักจะส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปในทางดีหรือเลวลงก็ได้ เช่น เนื้อเยื่อหนาขึ้น ขนาดใหญ่ขึ้น รูปร่างอาจแตกต่างจากเดิม กิจกรรมของเซลล์อาจเปลี่ยนแปลงไปได้ อัตราการเจริญเติบโตอาจช้าหรือเร็วกว่าปกติ เป็นต้น ซึ่งต้องนำมาตัดเลือกลักษณะที่ดีอีกที และหลังจากมีการแบ่งเซลล์ต่อๆ ไปจำนวนโครโมโซมอาจเปลี่ยนแปลงโดยไม่ครบทั้งชุดก็ได้ จึงอาจพบเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมหลายแบบ นอกจากนี้ยังมีสารเคมีหลายชนิดที่สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเห็ด เช่น กรด นิโคตินิก (nicotinic acid) เป็นต้น

8.4 การใช้พิษงู พิษงูประกอบด้วยสารพิษต่างๆ มากกว่า 20 ชนิด เป็นโปรตีนเกิน 90% ซึ่งอยู่ในรูปของ polypeptide toxins และเอนไซม์ (enzymes) ที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรท ซึ่งอยู่ในรูปของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และมีส่วนประกอบอื่นๆ สารพิษบางชนิดมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตได้ Holliday et al. (2004) ได้รายงานการใช้พิษงูหางกระดิ่งเพชรดำ (Westem diamondback rattlesnake; *Crotorus atrox*) มาใช้ในการผลิตเห็ดถั่งเช่าลูกผสม (*Cordyceps hybrids*) โดยการเติมพิษงู 10-30 มิลลิกรัม ต่ออาหารวุ้น 300 มิลลิลิตร อาหารวุ้นประกอบด้วยน้ำกลั่น 2.1 ลิตร มอลต์สกัด 50 กรัม วุ้น 34 กรัม ฮิวมัส 10 กรัม ถ่านกัมมันต์ 5 กรัม ดีเกลือ ($MgSO_4$) 1 กรัม สารละลายด่างคลี (KOH 1%) 10 มิลลิลิตร โดยทำการใส่เชื้อต่างสายพันธุ์กันลงบนผิวอาหารวุ้นในจานเพาะ จะใส่เชื้อสายพันธุ์แต่ละจุด แล้วปล่อยเส้นใยเจริญเข้าหากันจนเกิดโซนรวมของเส้นใยเห็ด จากนั้นจะแยกเส้นใยบริเวณนั้นออกมาเพาะเปรียบเทียบดูความแตกต่างกับสายพันธุ์เดิม คัดเอาที่ดีกว่าเดิมไปขยายเพาะต่อไป

9. หลักการการเก็บรักษาเชื้อราเห็ดถั่งเช่า

จุดประสงค์การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ คือ การรักษาเชื้อไว้ในสภาพที่มีชีวิตอยู่ มีคุณสมบัติเหมือนเดิม และไม่ให้เกิดการปนเปื้อน วิธีการเก็บรักษาเชื้อราเห็ดถั่งเช่าใช้หลักการเดียวกับการเก็บรักษาเชื้อราชนิดอื่นๆ ซึ่งมีหลายวิธี แต่มีหลักการสำคัญที่เหมือนกัน คือ การทำให้เชื้อราเห็ดหยุดหรือลดการเจริญเติบโตโดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ ได้แก่

9.1 อาหาร เชื้อเจริญดีที่สุดบนวุ้นเอียงภายในหลอดหรือขวด โดยทั่วไปแล้วจะใช้อาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar)

9.2 อุณหภูมิ โดยทั่วไปแล้วเชื้อราเห็ดสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 °C แต่เห็ดถั่งเช่าสีทองจะชอบอุณหภูมิต่ำประมาณ 18-25 °C

9.3 แสง เชื้อราบางชนิดจะชอบเจริญในที่มืด บาชนิดจะชอบเจริญในที่มีแสง โดยทั่วไปแล้วเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจะนิยมเก็บในที่มืด

9.4 อากาศ เชื้อราเห็ดโดยทั่วไปแล้วเป็นพวกต้องการอากาศ เมื่อเจริญบนอาหารภายในหลอดหรือขวดปกติจะได้รับอากาศที่เพียงพอโดยผ่านจุกสำลี หรือฝาเกลียวที่ไม่ได้แน่นจนเกินไป

10. เทคนิคการเก็บรักษาเชื้อราเห็ดถั่งเช่า

การเก็บรักษาเชื้อเห็ดโดยทั่วไปมีวิธีการดังนี้ (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 71; สมบูรณ์ ธนาสุภาวัฒน์, 2553, น. 24)

10.1 การต่อเชื้อหรือการเปลี่ยนอาหารใหม่ (sub-culture) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและบ่มไว้ในสภาพที่เหมาะสม เมื่อถึงเวลาที่อาหารหมดจึงต่อเชื้อลงในอาหารใหม่ ทำเช่นนี้เรื่อยไป จุลินทรีย์จึงมีชีวิตอยู่ได้ตลอดไป วิธีนี้มีข้อดีคือ ประหยัดค่าใช้จ่าย ทำง่าย ไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษ สามารถใช้เก็บรักษาจุลินทรีย์ทั่วไปได้นานพอสมควร แต่มีข้อเสีย เช่น ต้องใช้เวลาและแรงงานมากในการเตรียมอาหารและการเพาะเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีเชื้อจำนวนมากและต้องใช้พื้นที่มากในการเก็บหลอดเชื้อ ในขณะการต่อเชื้อลงบนอาหารใหม่อาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น นอกจากนี้การต่อเชื้อบ่อยๆ อาจทำใช้เชื้อกลายพันธุ์ได้ Sung et al. (2006) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น Sabouraud Dextrose agar plus Yeast Extract (SDAY) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นทำการต่อเชื้อ (subculture) จำนวน 10 ครั้ง ในแต่ละครั้งของการ subculture นำเส้นใยมาทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกในอาหารข้าวผสมดักแด้ไหม พบว่า เมื่อทำการต่อเชื้อจำนวน 2 ครั้งขึ้นไปเชื้อจะเริ่มมีความเปลี่ยนแปลง โดยสีของโคโลนีเปลี่ยนแปลงไปมากขึ้นและการพัฒนาไปเป็นดอกจะลดลง

10.2 การเก็บภายใต้น้ำมันแร่ (storage under mineral oil) การเทน้ำมันแร่ทับเชื้อที่เจริญบนผิววุ้นช่วยป้องกันการเสียน้ำ ช่วยลด metabolic activity และลดออกซิเจน ทำให้เชื้อเจริญน้อยการเก็บรักษาด้วยวิธีนี้อาจเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อในอากาศ และเมื่อนำเชื้อออกมาเลี้ยงใหม่เชื้อจะเจริญช้า เชื้อบางชนิดอาจสูญเสียความสามรถสร้าง ascospors แต่วิธีการนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงและตัวไรไม่เข้าสู่เชื้อ

10.3 การเก็บรักษาในดิน (soil storage) ทำได้โดยการเตรียม suspension ของสปอร์โดยใช้น้ำที่ปราศจากเชื้อ เติม suspension 1 มิลลิลิตร ลงในดินสวนที่ทำให้ปราศจากเชื้อ ปล่อยให้เชื้อเจริญและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น 4-7 °C การนำเชื้อออกมาเลี้ยงใช้เข็มเขี่ยเม็ดดินที่มีเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม การเก็บในตู้เย็นเชื้อจะรอดชีวิตได้ยาวนานถึง 10 ปี และเชื้อรายังคงมีสภาพทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง

10.4 การเก็บรักษาไว้ในเมล็ดธัญพืช เชื้อเห็ดและเชื้อราบางชนิด สามารถเก็บรักษาในเมล็ดธัญพืชได้ เช่น เชื้อรากลุ่ม *Sclerotinia* sp, *Magnaporthe* sp, *Leptosphaeria* sp และ *Rhizoctonia* sp. สามารถเก็บได้นานมากกว่า 10 ปี ในข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวสาลี และข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดธัญพืชแช่น้ำค้างคืน อาจมีการเติมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ในปริมาณ 250 กรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้สะเด็ดน้ำและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเมล็ดธัญพืชใส่ในขวดแก้ว McCartney vials ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเชื้อราที่เจริญในอาหารวุ้นลงไปในขวดที่บรรจุเมล็ดธัญพืช นำไปบ่มเพื่อให้เส้นใยเจริญที่อุณหภูมิ 23-27 °C เป็นเวลา 7-10 วัน เสร็จแล้วทำให้แห้งในถาดดูดความชื้น Mataa and Savoie (2013, pp. 96-102) ได้รายงานผลการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อเห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus subrufescens*) ในเมล็ดข้าวฟ่าง แล้วนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ ที่อุณหภูมิ 25 °C ที่อุณหภูมิ 4 °C และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C พบว่า การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 °C จะมีประสิทธิภาพในการเก็บเชื้อเห็ดได้ดีที่สุด

10.5 การเก็บไว้ในน้ำ (water storage) เป็นวิธีการง่ายๆ ราคาถูก ทำโดยตัดชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมขนาด 6 ตารางมิลลิเมตร จากโคโลนี ให้ได้ปลายเส้นใยที่กำลังเจริญ นำไปวางลงในน้ำปราศจากเชื้อภายในขวด McCartney เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15 °C

10.6 การเก็บรักษาในซิลิกาเจล (siliga gel storage) วิธีนี้ใช้เก็บเชื้อราที่สร้างสปอร์ได้นานกว่า 11 ปี วิธีนี้ใช้เก็บได้ปานกลาง แต่เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและราคาถูก เชื้อไม่เปลี่ยนแปลงและเชื้อไรเข้าไม่ได้ Tariq et al. (2015, pp. 147-151) ได้รายงานผลการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรคพืช (phytopathogenic fungi) ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum f.* sp. *lentis*, *Fusarium oxysporum f.* sp. *capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Curvularia lunata* โดยวิธีการต่างๆ คือ เก็บรักษาในซิลิกาเจล เก็บรักษาในเมล็ดธัญพืช เก็บรักษาภายใต้น้ำมันแร่ เก็บรักษาในดิน และเก็บรักษาในน้ำกลั่น เป็นเวลา 2 ปี โดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา เส้นผ่าศูนย์กลาง

ของโคโลนี สี ลักษณะพื้นผิว ขอบเขตพื้นที่ และการสร้างสปอร์ พบว่า เชื้อราที่เก็บรักษาไว้บนซิลิกาเจลทำให้เชื้อราคงสภาพการมีชีวิตได้ดีกว่าวิธีการอื่นๆ

10.7 การทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (lyophillization หรือ freeze-drying) เป็นการทำให้น้ำระเหยไปจาก suspension เชื้อที่เยือกแข็งแล้ว โดยนำจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารวุ้นมาผสมกับสารแขวนลอย (suspending medium) เช่น สคิมมิลค์ (skim milk) หรือกลูโคซีรัม (glucose serum) แล้วนำไปเข้าสุญญากาศ น้ำในเซลล์จะถูกดึงออกโดยการระเหิด จุลินทรย์จะอยู่ในสภาพแห้งและแข็ง แต่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานมากกว่า 10 ปี ข้อดีของวิธีนี้คือ เหมาะสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมาก และเก็บรักษาได้นาน แต่การทำซับซ้อนและเสียค่าใช้จ่ายสูง เหมาะสมเฉพาะเชื้อที่สร้างสปอร์เท่านั้น

10.8 การแช่แข็ง (freezing) เป็นการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพเย็นจัด ใช้ได้กับจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด โดยทั่วไปจะนิยมเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen storage) ที่อุณหภูมิ -196 °C โดยเชื้อจะอยู่ในสภาพพักตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype และ genotype ทำให้ปลอดภัยพอสมควร โดยเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นและเติมกลีเซอรอล (glycerol) หรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide: DMSO) เพื่อป้องกันเซลล์แตก แล้วถ่ายใส่หลอดปิดฝาให้สนิท นำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิเพื่อให้อุณหภูมิลดลงมาถึงจุดเยือกแข็งในระดับ -35 °C แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 °C วิธีการนี้เก็บเชื้อได้นานถึง 30 ปี โดยไม่เกิดการปนเปื้อนเชื้ออื่น แต่มีข้อเสีย คือ อุปกรณ์มีราคาแพงและมีราคาสูง สิ้นเปลืองไนโตรเจนเพราะระเหยตลอดเวลา Kaur et al. (2011, pp. 234-238) รายงานผลการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อราเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus* (U-3)) และเห็ดนางรมขาว (*Pleurotus florida* (PAU-5)) โดยเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารวุ้น PDA ในกลีเซอรอล 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (25-35 °C), -20 °C และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลา 6 เดือน ทำการตรวจวัดคุณสมบัติทางกายภาพ (อัตราการเจริญเติบโต และผลิตผลที่ได้) คุณสมบัติทางเคมี (สาร β-1,4 endoglucanase) และการเกิดดอกเห็ด ซึ่งพบว่า เชื้อเห็ดกระดุมและเห็ดนางฟ้าขาวที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจะคงคุณสมบัติต่างๆ ได้ดีที่สุด แต่สำหรับการใช้งานปกติทั่วไปนั้นวิธีการต่อเชื้อก็ยังเป็นที่นิยมอยู่ การเก็บรักษาวิธีนี้สามารถใช้เก็บเชื้อราที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ได้

การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองหลังการเก็บเกี่ยว

เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสามารถเก็บผลผลิตโดยการกรองเอาเส้นใยเห็ด หากเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเหลวจะสามารถเก็บผลผลิตเห็ดเป็นลักษณะแผ่นเส้นใยเห็ด หลังจากเก็บผลผลิตแล้วนำมาทำให้แห้งเพื่อลดอัตราเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อรา โดยอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียดเพื่อบรรจุแคปซูล ในกรณีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจนเป็นดอกเห็ดนั้น เห็ดถั่งเช่าสีทองเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตออกจากภาชนะที่เพาะเลี้ยงแล้วดอกเห็ดจะเหี่ยวลงเมื่อโดนอุณหภูมิและอากาศทั่วไป และถ้าปล่อยทิ้งไว้นานอาจปนเปื้อนเชื้อราและเกิดการเสื่อมสภาพของเห็ดได้ การทำแห้งของเห็ดถั่งเช่าในระดับอุตสาหกรรมเมื่อเพาะให้เกิดดอกแล้วจะอบแบบถาด (tray dryer) ในเตาอบที่อุณหภูมิ 60-70 °C เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง หรือ 50-55 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555ข, น. 65) ภายหลังจากการอบแห้งแล้ว ในช่วงระยะเวลาที่รอแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ นั้น จะต้องเก็บดอกเห็ดที่ผ่านการอบแห้งแล้วให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อเป็นการยืดระยะเวลาการเก็บรักษา และรักษาคุณภาพของเห็ดไม่ให้ลดลงไปกว่าเดิมมากนักเพื่อจำหน่ายหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต่อไป วิธีการเก็บรักษาเห็ดอบแห้งก็มีลักษณะเช่นเดียวกับการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารแห้งชนิดอื่นๆ ทั่วไป อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาควรเลือกใช้วิธีการและชนิดบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่จะนำมาใช้ให้มีความเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์

1. วิธีการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง

ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการทำแห้งที่ทันสมัยมากขึ้น การทำแห้งเป็นวิธีการดึงน้ำ (dehydration) ออกจากผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นการลดความชื้นในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือลดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity; a_w) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ โดยอาหารที่มีความชื้นต่ำกว่า 12% หรือมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.60 จะไม่มีจุลินทรีย์ใดๆ สามารถเจริญได้ (นิอร โฉมศรี, 2555, น. 64) ดังนั้นการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์จึงไม่ใช่ปัญหาสำคัญ แต่มักประสบปัญหาการเสื่อมเสียคุณภาพเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นผลิตภัณฑ์เหล่านี้จึงควรบรรจุให้อยู่ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจน (O_2 < 0.1%) งามทิพย์ ภู่วโรดม (2538, น. 51) ได้สรุปวิธีการบรรจุอาหารแห้งให้อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนไว้ 3 วิธี คือ

1.1 การใช้ระบบสุญญากาศในการบรรจุ การบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารที่ค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลงจากผลของออกซิเจน นอกจากการใช้แก๊สแล้ว ในการบรรจุอาจใช้การดูดอากาศออก โดยใช้เครื่องบรรจุระบบสุญญากาศ ซึ่งภาชนะที่จะใช้บรรจุต้องสามารถทนต่อความดันที่แตกต่างกันได้ระหว่างสภาวะภายนอกและภายในภาชนะบรรจุ Naik et al. (2005, pp. 146-149) รายงานผลการศึกษาการเก็บรักษาเห็ดนางรมขาว (*Pleurotus florida*) อบแห้งในถุงพลาสติกแบบ

สุญญากาศเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในถุงพลาสติกที่ซีลด้วยความร้อนเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในถุงพลาสติกแบบสุญญากาศมีการลดลงของปริมาณโปรตีน อัตราการคืนตัว และการเพิ่มขึ้นของความชื้นน้อยกว่าการเก็บรักษาในถุงพลาสติกที่ซีลด้วยความร้อน และจากการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัส พบว่า การเก็บรักษาเห็ดแห้งในวิธีการเก็บรักษาแบบสุญญากาศ สามารถเก็บรักษาได้มากกว่า 3 เดือนขึ้นไป

1.2 การบรรจุโดยวิธี Modified Atmosphere Packaging (MAP) เป็นการใช้แก๊สในการบรรจุ ซึ่งแก๊สบางชนิดนิยมใช้ร่วมกันในการบรรจุอาหารแห้งที่ค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากผลของออกซิเจน เช่น อาหารแห้งที่มีไขมันไม่อิ่มตัวอยู่สูง มักมีการเติมแก๊ส เช่น แก๊สไนโตรเจน บรรจุลงในภาชนะบรรจุ ทำให้สภาวะแวดล้อมของอาหารภายในภาชนะบรรจุนั้นเป็นสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ จึงเกิดการเสื่อมเสียคุณภาพจากผลของออกซิเดชันยาก ซึ่งทำให้เป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

1.3 การใช้สารกำจัดออกซิเจน อาหารแห้งบางประเภทอาจใช้สารกำจัดออกซิเจน (deoxidizer) ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะที่อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้ โดยสารในภาชนะบรรจุดังกล่าวจะใส่ลงไปในภาชนะบรรจุอาหารแห้ง ซึ่งควรเป็นภาชนะปิดสนิท แก๊สไม่สามารถผ่านได้ สารดังกล่าวทำหน้าที่ดึงออกซิเจนออกซิเจนในภาชนะบรรจุ ช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่จะทำปฏิกิริยาต่างๆ ในการบรรจุอาหารแห้ง

นอกจากนี้การเก็บรักษาอาหารแห้งยังนิยมใช้สารดูดความชื้นร่วมด้วย เช่น แคลเซียมออกไซด์ (ซิลิกาเจล) ใส่ลงในภาชนะบรรจุเล็กๆ ที่ทำด้วยวัสดุที่ทำด้วยวัสดุที่ความชื้นสามารถผ่านเข้าออกได้ แล้วจึงใส่ภาชนะบรรจุที่มีสารดูดความชื้นดังกล่าวลงในภาชนะบรรจุที่บรรจุอาหารอีกทีหนึ่ง สารพวกซิลิกาเจลนี้จะช่วยในการดูดความชื้นในระหว่างการเก็บรักษาอาหารแห้ง นอกจากนี้ยังมีการใช้สารที่ช่วยป้องกันการเกาะตัวของอาหารผง เนื่องจากความชื้น เช่น แคลเซียมสเตียเรต ซึ่งใช้ใส่ลงในอาหารผง

2. รูปแบบและภาชนะบรรจุที่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง

งามทิพย์ ภู่วโรดม (2538, น. 74) แบ่งรูปแบบและภาชนะบรรจุที่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแห้งออกเป็น 3 แบบ คือ ถุงหรือซอง ถาดกับฟิล์มปิด และถาดกับถุง แต่ภาชนะที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ถุงหรือซอง และถุงที่ขึ้นรูปมาก่อน (Premade Bag) มีการใช้น้อยกว่าซองและมักพบในอุตสาหกรรมขนาดเล็กๆ สำหรับซองจะขึ้นรูปโดยเครื่องขึ้นรูป-บรรจุ-ปิดผนึก จากฟิล์มม้วนเดียวหรือ 2 ม้วนก็ได้ ขึ้นกับรูปร่างของซองที่ต้องการ ปัจจุบันฟิล์มพลาสติกได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ เช่น นำมาผลิตเป็นถุงพลาสติก ซองพลาสติก หรือถูกนำมาทอเป็นกระสอบ เป็นต้น โดยฟิล์มพลาสติกที่ใช้สำหรับผลิตบรรจุภัณฑ์สามารถผลิตได้จากฟิล์ม

หลากหลายประเภทขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้ผลิต เช่น ฟิล์มยืด ฟิล์มหด และฟิล์มลามิเนต (Laminated Films) ก็เป็นหนึ่งในฟิล์มหลายๆ ประเภทที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ในปัจจุบัน โดยฟิล์มพลาสติกลามิเนตก็คือ แผ่นฟิล์มพลาสติกที่ผ่านกระบวนการลามิเนตโดยการนำฟิล์มพลาสติกหลายๆ ชั้นมาเคลือบติดเข้าด้วยกันเป็นฟิล์มแผ่นเดียว หรือการเคลือบฟิล์มพลาสติกเข้ากับวัสดุอื่นๆ เช่น กระดาษหรือฟอยล์โลหะ โดยทำการยึดติดระหว่างชั้นฟิล์มด้วยการใช้ความร้อนหรือใช้กาว (adhesive) โดยฟิล์มลามิเนตจะมีจำนวนชั้นของฟิล์มมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับตามความต้องการของผู้ผลิต ซึ่งประเภทของฟิล์มและวัสดุที่นิยมนำมาผลิตฟิล์มลามิเนตสำหรับบรรจุภัณฑ์มีดังนี้ (สถาบันปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย, 2553)

2.1 ฟิล์ม Polyethylene (PE) ส่วนใหญ่นิยมใช้ฟิล์ม LDPE (Linear Density Polyethylene) และฟิล์ม LLDPE (Linear Low Density Polyethylene) ในชั้นในสุดหรือชั้นที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง โดยฟิล์ม PE ให้คุณสมบัติยืดหยุ่นได้ดี ทนความร้อนได้ สามารถใช้กับกระบวนการปิดผนึกด้วยความร้อนได้ (Heat Sealing) และยังสามารถต้านทานต่อการกัดกร่อนจากสารเคมีและการกัดกร่อนจากกรดบางประเภทได้ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ถุงเย็น ถุงซิป ฟิล์มยืด ฟิล์มหด ฟิล์มคลุมดิน

2.2 ฟิล์ม Polypropylene (PP) ฟิล์ม PP ที่นิยมใช้ในกระบวนการลามิเนต คือ ฟิล์ม CPP (Cast Polypropylene Film) และฟิล์ม BOPP (Biaxially Oriented Polypropylene Film) ซึ่งฟิล์มทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติโดดเด่นมากทั้งในด้านความใส ผิวมันวาว เหนียว ทนต่อแรงดึง ไม่มีไฟฟ้าสถิตย์ กันน้ำได้ดี ฟิล์ม CPP และ BOPP มัก ถูกใช้ควบคู่กันโดย CPP จะทำหน้าที่เป็นชั้นเคลือบเพื่อให้อาหารหรือสินค้าที่บรรจุปลอดภัยจาก ผลกระทบของสีที่พิมพ์ลงบน BOPP ฟิล์ม ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ฟิล์มหุ้มซองบุหรี่

2.3 ฟิล์ม Polyester (PET) ฟิล์ม PET ที่นำมาใช้ในการลามิเนตคือฟิล์ม BOPET (Biaxially Oriented Polyethylene Terephthalate) มีผิวที่เงางาม เรียบ มีความใส ทนทานต่อการฉีกขาดหรือการกด กระแทก รักษารูปทรงได้ดีในอุณหภูมิระดับต่างๆ ทนความร้อนสูง สามารถใช้กับไมโครเวฟได้ ทนทานต่อความชื้น ทนสารเคมีและตัวทำละลายได้หลากหลายประเภท สามารถป้องกันการซึมผ่านของแก๊สต่างๆ ได้ดี และมีคุณสมบัติในการถนอมและรักษากลิ่นของอาหารและรักษาความกรอบของขนมขบเคี้ยวได้ดีกว่าฟิล์ม BOPP ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ชนิดอ่อน ฟิล์มสำหรับแผงโซลาเซลล์

2.4 ฟิล์ม Nylon, Polyamide (PA) ฟิล์ม PA ที่นิยมนำมาใช้ในการลามิเนต ก็คือ ฟิล์ม BOPA (Biaxially Oriented Polyamide Film) มีคุณสมบัติที่ดีในการต้านทานการรั่วซึม ทนต่ออุณภูมิร้อน-เย็น มีความเหนียวเป็นพิเศษ BOPA จึงสามารถนำมาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์สุญญากาศสำหรับบรรจุอาหารได้ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์สุญญากาศสำหรับอาหารแช่แข็ง ถุงข้าวสาร

2.5 ฟิล์ม Metalized เป็นฟิล์มพลาสติกที่ผ่านกระบวนการฉาบด้วยโลหะอลูมิเนียม (Aluminum) ทำให้ซองบรรจุภัณฑ์มีสีสันแวววาว กันการซึมผ่านของแก๊สได้ดี ช่วยยืดอายุของสินค้าภายในได้ดีกว่าแผ่นฟิล์มชนิดธรรมดา ฉะนั้นฟิล์ม Metalized จึงเหมาะกับการนำไปใช้งานในด้านบรรจุภัณฑ์เป็นอย่างมาก โดยฟิล์ม metalized ที่นิยมใช้ในการลามิเนตได้แก่ M-BOPA (Metalized Nylon Film), M-CPP (Metalized Cast Polypropylene Film) M-PET (Metalized Polyester Film) เป็นต้น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ซองขนม ซองกาแฟสำเร็จรูป 3in1

2.6 ฟอยล์อลูมิเนียม (Aluminum foil) ฟอยล์อลูมิเนียมมีคุณสมบัติสำหรับการผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ดีที่สุดถ้าเทียบกับฟิล์มพลาสติกชนิดอื่นๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น แต่ก็มีราคาแพงที่สุดเช่นกัน โดยฟอยล์อลูมิเนียมมีคุณสมบัติในการป้องกันได้ทั้งแก๊สต่างๆ กันการซึมผ่านของแก๊ส นำกลิ่นน้ำมันและแสงได้อย่างดีเยี่ยม ทำให้สามารถปกป้องและถนอมผลิตภัณฑ์ที่บรรจุอยู่ภายในได้ยาวนานกว่าฟิล์มชนิดอื่นๆ อลูมิเนียมฟอยล์ใช้ได้กับบรรจุภัณฑ์อาหาร ยา ฯลฯ ทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว ถ้าหากผลิตภัณฑ์กัดกร่อนได้ก็ยังสามารถเคลือบฟอยล์อลูมิเนียมด้วยสารอื่นๆ ที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ และผิวของฟอยล์อลูมิเนียมก็มีความมันวาวสวยงามเช่นเดียวกับฟิล์ม Metalized อีกด้วย

นอกจากฟิล์มลามิเนตแล้ว ยังมีฟิล์ม PVC (Polyvinyl chloride) ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่ง PVC เป็นพลาสติกที่สามารถแปรเปลี่ยนสมบัติได้ โดยการเติมสารเคมีปรุงแต่ง (additives) ต่างๆ เช่น plasticizer, modifier และ fillers ทำให้ PVC นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ มากกว่าอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ โดย PVC มักใช้ในรูปแบบของขวด ฟิล์มและแผ่น ถึงแม้ว่าเคยมีข่าวจะให้เลิกใช้ PVC ในบรรจุภัณฑ์ เนื่องจากมีสารตกค้างของไวนิลคลอไรด์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดมะเร็งตับได้ แต่วิวัฒนาการทางด้านการผลิตในปัจจุบัน ทำให้สามารถผลิต PVC ที่มีไวนิลคลอไรด์ตกค้างน้อยกว่า 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ส่งผลให้บรรจุภัณฑ์ที่ทำจาก PVC นี้ปลอดภัยสำหรับใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร ในแง่ของการผลิตฟิล์ม PVC จะผลิตยากกว่าฟิล์ม PE หรือ PP จุดเด่นของฟิล์ม PVC คือ ทนต่อน้ำมันและกันกลิ่นได้ดี ใส แข็งแรงทนทานต่อการเสียดสี ในขณะที่ความต้านทานต่อการซึมผ่านของความชื้นอยู่ในขั้นปานกลาง อุณหภูมิใช้งานของ PVC ไม่เกิน 90 °C และถ้าอุณหภูมิการใช้งานเกินกว่า 137 °C จะเริ่มเปลี่ยนคุณภาพ ขวด PVC สามารถ

ใช้แทนที่ขวดแก้ว เนื่องจากเบากว่าและตกไม่แตก แต่ในระยะหลังถูกแย่งตลาดโดยขวด PET เนื่องจากเหตุผลทางด้านสิ่งแวดล้อมดังได้กล่าวมาแล้ว ส่วนแผ่น PVC มักใช้กับบรรจุภัณฑ์แบบการ์ด ประเภทบลิสเตอร์แพ็ค (blister pack) เนื่องจากมีความใสและเหนียว การใช้งานของ PVC กับผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ นิยมใช้ทำฟิล์มยืดสำหรับห่อเนื้อสัตว์สด เนื้อสัตว์แช่เยือกแข็ง ผักและผลไม้สด เนื่องจากความใสและมันวาว ทำให้เห็นผลิตภัณฑ์ได้ดีและอัตราการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำอยู่ในช่วงที่เหมาะสม นิยมใช้ทำถาดบรรจุอาหารแห้ง เช่น ขนมปังกรอบ คุกกี้ ช็อกโกแลต และอื่นๆ เพื่อแบ่งเป็นสัดส่วนและป้องกันการแตกหัก นิยมใช้ทำถาดหรือกล่องบรรจุอาหารสด นิยมใช้ทำขวดบรรจุน้ำมันพืชปรุงอาหาร เป็นต้น มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำพลาสติกและภาชนะบรรจุภัณฑ์ชนิดต่างๆ มาใช้ในการเก็บรักษาเห็ดเศรษฐกิจหลายชนิดทั้งเห็ดสดและแห้ง ตัวอย่างเช่น

Xing et al. (2008, pp. 11838-11844) ได้ศึกษาชนิดของฟิล์มที่แตกต่างกันในการเก็บรักษาเห็ดชิเมจิ (*Hypsizygus marmoreus*) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพหลังการเก็บเกี่ยวร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่จะมีบทบาทในการเสื่อมสภาพของเซลล์ โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 16-24 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 65-70 พบว่า ฟิล์มชนิด BOPP เป็นฟิล์มที่เก็บรักษาลักษณะของเห็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด เช่น ค่าความแน่นเนื้อ การเกิดเส้นใยรา ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และมีการเกิดสาร malondialdehyde ต่ำในระหว่างการเก็บรักษา และยังพบกิจกรรมเอนไซม์ proteinase ต่ำเมื่อหุ้มด้วยฟิล์มชนิดนี้ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase และ polyphenol oxidase มีค่าสูงขึ้นหลังจากนั้นมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

อัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ (2550) ได้ศึกษาวิธีการบรรจุและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาเห็ดหอมสดให้มีคุณภาพดี โดยทำการเก็บรักษาเห็ดหอมสดในห้องเย็นอุณหภูมิ 9 °C, 6 °C และ 2 °C บรรจุเห็ดหอมในถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC เจาะรูขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 รู และบรรจุเห็ดหอมในถุงพลาสติก PE สภาพสุญญากาศ (vacuum) เปรียบเทียบคุณภาพของเห็ดหอมที่บรรจุในถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติก PVC เจาะรู 4 รู ทั้ง 3 อุณหภูมิ พบว่า ที่อุณหภูมิ 9 °C, 6 °C และ 2 °C มีการบานของดอกเห็ด ในวันที่ 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ ลักษณะของดอกเห็ดยังสดและสีของดอกเห็ดไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนการบรรจุเห็ดหอมในถุงพลาสติก PE สภาพสูญญากาศ (vacuum) มีกลิ่นผิดปกติเกิดขึ้นภายในถุง แต่ลักษณะของดอกเห็ดยังสดอยู่และไม่มีการบานของดอกเห็ด เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน มีการสูญเสียน้ำหนัก 0.66-5.94% และการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้น 1.21-9.03 % หลังเก็บรักษานาน 21 วัน จากการ

ทดลองครั้งนี้ พบว่า การบรรจุเห็ดหอมในถุงฟิล์ม PE สภาพสูญญากาศ (vacuum) ระยะเวลา 4-100 วัน ทั้ง 3 อุณหภูมิ แล้วเจาะรูถุงฟิล์มขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 4 รู เป็นวิธีที่ดีที่สามารถช่วยชะลอการบานของดอกเห็ด ลดการเกิดกลิ่นผิดปกติ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเห็ดหอมสดให้มีคุณภาพ และเก็บรักษาได้นานขึ้น คือ 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 9 °C, 6 °C และ 2 °C ตามลำดับ

Dama et al. (2010, pp. 650-655) ได้ศึกษาการเก็บรักษาเห็ดสดจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Hyspizygus ulmarius*, *Pleurotus florida* PF-01, *Pleurotus florida* PF-01 R5, *Pleurotus platypus* และ *Pleurotus sajor-caju* PSC-04 ในฟิล์ม PP ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 °C โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสี ความชื้น อัตราการคืนตัว และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ peroxidase (POX) ทุก 48 ชั่วโมง จนกระทั่งเห็ดเสื่อมสภาพ พบว่า เห็ดมีการเปลี่ยนแปลงของสีอย่างมีนัยสำคัญในทั้งสองอุณหภูมิ โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C จะคงสภาพของสีได้นานกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 10 °C ส่วนความชื้นและอัตราการคืนตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักในระหว่างการเก็บรักษา ผลการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสอง ชนิด พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ SOD มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C และ 10 °C โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ 10 °C จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C ส่วนเอนไซม์ POX ค่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงแรกและมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในทั้งสองสภาวะของการเก็บรักษา

สุภา อโนธารมณ์ และคณะ (2551, น. 262) ได้ศึกษาการเก็บรักษาเห็ดฟาง โดยทำการลดอุณหภูมิในเห็ดฟาง (Pre cooling) แบบ Room cooling ที่ห้องอุณหภูมิ 10 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75-95% นาน 1 ชั่วโมง พบว่า สามารถช่วยรักษาความสด คือ ลดการหายใจและคายน้ำของผลิตผล ทำให้เห็ดไม่เหี่ยวเร็วและชะลอการเน่าเสีย จากนั้นนำเห็ดฟางผ่านการตัดแต่งแล้วบรรจุในภาชนะบรรจุต่างๆ กัน 5 กรรมวิธี คือ การบรรจุเห็ดฟางในตะกร้าพลาสติกโปร่ง การบรรจุเห็ดฟางในถาดโฟมแล้วห่อหุ้มด้วยฟิลม์ PVC การบรรจุเห็ดฟางในกล่องพลาสติกแล้วปิดฝา การบรรจุเห็ดในกล่องพลาสติกร่วมด้วยสารดูดซับออกซิเจน (O_2) และการบรรจุเห็ดในกล่องพลาสติก ซึ่งมีแผ่นฟองน้ำวางรองและวางบนเห็ดฟาง แล้วเก็บรักษาไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 15 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95% ทำการตรวจสอบคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยว 2, 4, 6 และ 8 วัน พบว่า การเก็บรักษาเห็ดฟางในตะกร้าพลาสติกโปร่ง มีการสูญเสียน้ำหนักมากที่สุด คือ ภายหลังการเก็บรักษาไว้นาน 2, 4 และ 6 วัน มีการสูญเสียน้ำหนักถึง 5.9%, 13.2% และ 22.4% ซึ่งต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ คือ การบรรจุในถาดโฟมแล้วห่อหุ้มด้วย PVC การบรรจุในกล่องพลาสติกใสหรือ

การบรรจุในกล่องพลาสติกซึ่งปูรอง และวางบนเห็ดฟางด้วยแผ่นฟองน้ำ มีการสูญเสียน้ำหนักเมื่อ 6 วันหลังการเก็บรักษา คือ 2.8%, 2.8% และ 3.7% ตามลำดับ ส่วนการบรรจุเห็ดในกล่องพลาสติกร่วมด้วยสารดูดซับ O_2 มีการสูญเสียน้ำหนักต่ำที่สุด คือ 1.8% เท่านั้น และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการตรวจสภาพความสดก็เช่นกัน เมื่อเก็บเห็ดฟางนานถึง 8 วัน ทุกภาชนะบรรจุปรากฏว่าเห็ดมีความสดในระดับ 3 คือผลเห็ดฟางมีรอยเหี่ยวมาก โดยเฉพาะการบรรจุเห็ดในตะกร้าพลาสติกโปร่งนั้น เห็ดฟางมีความสดอยู่ในระดับ 5 คือผลเห็ดยุบตัวและน้ำหมดสภาพการซื้อขายตั้งแต่ 6 วันหลังการเก็บรักษา ยกเว้นเห็ดฟางที่บรรจุในกล่องพลาสติก ซึ่งใช้แผ่นฟองน้ำวางบนและล่างผลเห็ดฟางเห็ดมีความสดอยู่ในระดับ 1.77

3. คุณสมบัติและอิทธิพลของบรรจุภัณฑ์ต่อคุณภาพอาหาร

เนื่องจากภาชนะบรรจุจะทำหน้าที่ป้องกันสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อการเสื่อมเสียการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในระหว่างการเก็บรักษา วัสดุบรรจุที่จะพิจารณานำมาใช้ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, น. 89)

3.1 ป้องกันการซึมผ่านของแก๊สได้ดี (Gas Barrier) ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอายุเก็บรักษาสูง จะต้องใช้วัสดุที่มีค่าอัตราการซึมผ่านของแก๊สต่ำ เพื่อไม่ให้ความเข้มข้นของแก๊สภายในภาชนะเปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป โดยเฉพาะแก๊สออกซิเจนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี เช่น lipid oxidation ซึ่งทำให้อาหารเกิดกลิ่นหืน และยังเป็นผลให้อาหารสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ โดยเฉพาะกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) บรรจุภัณฑ์อาหารแห้งที่ดีจะต้องสามารถป้องกันก๊าซออกซิเจนจากสภาวะอากาศรอบๆ ผ่านเข้าไปในภาชนะบรรจุ นอกจากนี้อาจใช้สารดูดซับออกซิเจน (oxygen absorber) เพื่อช่วยดูดซับออกซิเจนที่มีอยู่แล้วในบรรจุภัณฑ์ก่อนปิดผนึกและจะซึมผ่านบรรจุภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาอัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจนสำหรับฟิล์มที่นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง การเลือกใช้วัสดุบรรจุจะพิจารณาจากความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์และอายุการเก็บรักษาที่ต้องการ โดยทั่วไปสำหรับอายุการเก็บ 2-6 เดือน ควรใช้วัสดุที่มีค่าอัตราการซึมผ่านของออกซิเจนไม่เกิน 2 cc/m^2 .24 hr.atm ที่ 75 °F อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจนสำหรับฟิล์มหลายชั้นที่นิยมใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารแห้งแสดงในตาราง 2

3.2 ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ (Water Vapor Barrier) บรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารแห้งจะต้องป้องกันการดูดซึมกลับความชื้นจากบรรยากาศ อากาศรอบๆ คือ ควรมีค่าอัตราการดูดซึมผ่านไอน้ำ (Water Vapor Transmission Rate, WVTR) ต่ำ ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดและคุณภาพ ตลอดจนความหนาของวัสดุที่ใช้ผลิตบรรจุภัณฑ์อาหารแห้งที่มีส่วนประกอบที่ดูดน้ำได้ดี

(hydroscopic) เช่น น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลฟรักโทส (fructose) ความชื้นจะเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารแห้งเสื่อมเสีย (food spoilage) ได้ดังนี้

3.2.1 การเสื่อมเสียทางกายภาพ เช่น การเกาะกันเป็นก้อนสำหรับอาหารผง ทำให้ไม่สามารถไหลได้อย่างเป็นอิสระ หรือมีการเยิ้มของน้ำตาล

3.2.2 การเสื่อมเสียทางเคมี เช่น การเกิดกลิ่นหืน (rancidity) เพราะน้ำเป็นสาเหตุเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้ไตรกลีเซอไรด์ในโมเลกุลของน้ำมัน และไขมันสลายตัวเป็นกรดไขมันอิสระ โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิด ปฏิกิริยา lipid oxidation

3.2.3 การเสื่อมเสียทางจุลินทรีย์ น้ำที่ดูดกลับไปในอาหารทำให้มีค่า water activity เพิ่มขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละประเภท จะมีค่า water activity ต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์เจริญได้ (minimum water activity) แตกต่างกัน ผลิตภัณฑ์อาหารแห้งมีแนวโน้มที่จะสูญเสียความชื้นหากอยู่ในบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุลของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น ฟิล์มที่เลือกใช้ควรป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดี โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีอายุเก็บรักษาสูง โดยทั่วไปอัตราการซึมผ่านไอน้ำควรมีค่าประมาณ 4-6 g/m^2 .24 hr หากพบหยดน้ำภายในภาชนะเนื่องจากฟิล์มที่ใช้มีค่า WVTR ต่ำเกินไป แต่เมื่อพิจารณาคุณสมบัติด้านอื่นๆ เช่น การป้องการซึมผ่านของแก๊ส ความเหมาะสมกับเครื่องบรรจุอัตโนมัติ ราคาและอื่นๆ อัตราการซึมผ่านของไอน้ำสำหรับฟิล์มหลายชั้นที่นิยมใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารแห้งดังตาราง 2

3.3 ป้องกันการซึมผ่านของไอเอทานอลได้ดี (Ethanol vapor Barrier) วัสดุที่นำมาขึ้นรูปเป็นภาชนะจะต้องป้องกันการซึมผ่านของไอเอทานอลได้ดีเพื่อรักษาความเข้มข้นของไอเอทานอลให้สูงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ วัสดุที่เลือกใช้ควรยอมให้ไอเอทานอลซึมผ่านได้ไม่เกิน 2 g/m^2 .24 hr อัตราการซึมผ่านของไอเอทานอลสำหรับฟิล์มพลาสติกบางชนิดแสดงในตาราง 3

3.4 สามารถปิดผนึกได้ด้วยความร้อน (Heat Sealability) ฟิล์มหลายชั้นที่ใช้จะมีฟิล์มชั้นในสุดเป็นตัวกลางเพื่อปิดผนึกด้วยความร้อน ที่นิยมใช้มาก เช่น LDPE, LLDPE บางกรณีอาจใช้ Ionomer เพื่อเพิ่มความต้านทานไขมัน การปิดผนึกด้วยความร้อนเป็นวิธีที่นิยมใช้มากกับฟิล์มพลาสติก เนื่องจากอัตราเร็วในการปิดผนึกสูงเหมาะกับเครื่องบรรจุอัตโนมัติและความสมบูรณ์ของรอยปิดผนึกมีมาก

3.5 ต้านทานการซึมผ่านของไขมัน (Grease and Oil Resisitance) ฟิล์มที่เลือกใช้ควรต้านทานการซึมผ่านของไขมันออกมาภายนอกได้ดี มิฉะนั้นลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์จะไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ฟิล์มต่างๆ ที่แสดงในตาราง 2 สามารถต้านทานการซึมผ่านของไขมันได้ดี (ยกเว้น LDPE)

3.6 เหมาะสมกับเครื่องจักรบรรจุอัตโนมัต (Machinability)

3.7 ลักษณะปรากฏสวยงาม (Good Appearance)

ตาราง 2 อัตราการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจนและไอน้ำสำหรับฟิล์มหลายชั้นที่นิยมใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารแห้ง

Film	Thickness (microns)	OTR* (cc/m^2 .24 hr.atm)	WVTR** (g/m^2 .24 hr)
PET/Al/PE	12/7/40	0	0-10
OPP/EVOH/PE	25/10/65	0.4-0.8	3-4
Met.PET/PE	12/50	.2-6	0.5-6
K-ON/PE	18/40	4-8	6-8
K-PET/PE	15/40	4-10	4-6
K-Cello/PE	25/40	1-13	9-11
K-OPP/PE	25/40	10-20	3-5
OPP/PE	25/50	2,000-3,000	6

หมายเหตุ: * OTR = Oxygen Transmission Rate ** WVTR = Water Vapor Transmission Rate

ที่มา: Kadoya, 1990 อ้างถึงใน งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, น. 87

ตาราง 3 อัตราการซึมผ่านของไอเอทานอลสำหรับฟิล์มพลาสติกบางชนิด

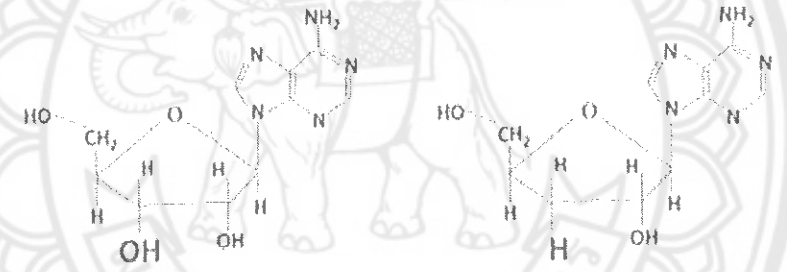
Film	Thickness (microns)	Permeability of Ethanol vapor (g/m^2 .24 hr)
K-ON/LDPE	15/40	0.7
BOPD/EVOH/LDPE	25/15/40	0.8
K-PET/CPP	12/40	0.9
K-OPP/CPP	20/40	1.0
Met.PET/LDPE	12/40	1.2
K-OPP/CPP	20/30	1.3
K-Cello/LDPE	#350/40	1.4
PET/CPP	12/40	1.8
BOPP/CPP	20/30	2.0
HDPE	50	4.1
BOPP	30	4.7
BON/LDPE	15/40	7.3
CPP	40	8.0
Cello/LDPE	#300/40	12.4
LDPE	50	19.0
LDPE	30	27.3
EVA	50	56.1

ที่มา: Kadoya, 1990 อ้างถึงใน งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, น. 89

การตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากข้อมูลการตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้เราทราบว่ามีจำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่มีอยู่ในเห็ดถั่งเช่า แต่ในทางการค้าการส่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่า เพื่อวัดคุณภาพและในรายงานผล (Test report) ส่วนใหญ่จะวัดหาปริมาณของสารกลุ่มนิวโครโอไซด์ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน (Li et al., 2006, pp. 800-805) สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินจัดอยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะกรดนิวคลีอิก โดยสารอะดีโนซีนเป็นหน่วยเล็กของโปรตีนที่

เรียกว่า กรดอะมิโน ในชื่อ ATP (adenosine triphosphate) และ ADP (adenosine di phosphate) และอนุพันธ์อีกหลายตัว ส่วนหนึ่งของร่างกายของสิ่งมีชีวิตสามารถสร้างสารอะดีโนซีนได้เองในปริมาณเล็กน้อยในพลาสมาของเลือดเพื่อใช้เป็นภูมิต้านทาน และภูมิคุ้มกันโรคภัยต่างๆ ที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม อีกทั้งในทางการแพทย์ยังใช้ ATP และ ADP ที่สกัดจากสารธรรมชาติมาเสริมฤทธิ์ เพื่อเพิ่มภูมิต้านทานให้กับร่ากายได้อีก บทบาทของสารอะดีโนซีนต่อร่างกายของเราจึงเสมือนเป็นทหารรักษาการ ปกป้อง หรือคุ้มภัย ส่วนสารคอร์ไดเซปินเป็นอนุพันธ์ของสารอะดีโนซีนโดยมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกัน ประกอบด้วยเบสอะดีนีน (adenine) จับกับน้ำตาลที่มีคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม แต่มีความแตกต่างกันตรงที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของคอร์ไดเซปินจะไม่มีหมู่ OH มาจับ ดังภาพ 8 จากสรรพคุณที่ได้กล่าวไว้แล้วของสารคอร์ไดเซปินที่ช่วยในเรื่องของการรักษาโรคต่างๆ สารคอร์ไดเซปินจึงเปรียบเสมือนทหารหน่วยโจมตี คือ ปราบปราม รักษาหรือบรรเทาอาการของโรคต่างๆ นั่นเอง



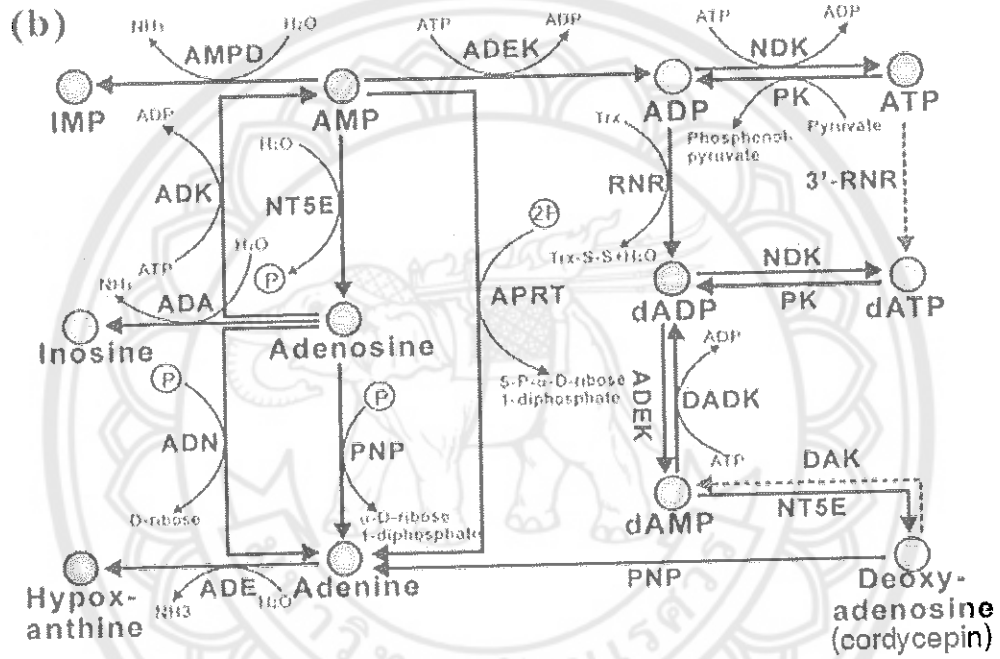
ภาพ 8 โครงสร้างของสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน

ที่มา: Chen et al., 2017, pp. 197-205

1. กระบวนการสังเคราะห์สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน

สำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินนั้นจะเริ่มจากสารอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate; AMP) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่สิ่งมีชีวิตสังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้สร้างพลังงานในกระบวนการหายใจระดับเซลล์มีน้ำเข้ามาร่วมทำปฏิกิริยาสลายพันธะ (hydrolysis) โดยมีเอนไซม์ 5'-nucleotidase (NT5E) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้ผลผลิตเป็นฟอสเฟตและอะดีโนซีน ส่วนการสังเคราะห์สารคอร์ไดเซปินนั้นก็เริ่มจาก AMP มีการใช้พลังงานไป 1 ATP ในปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ adenylate kinase (ADEK) ทำให้ AMP ถูกเปลี่ยนไปเป็นอะดีโนซีน

ไดฟอสเฟต (ADP) จากนั้น ADP ถูกเปลี่ยนไปเป็น deoxy-adenosinediphosphate (dADP) โดยเอนไซม์ ribonucleotide reductase (RNR) ซึ่งจะใช้ thioredoxin (Trx) เป็น co-substrate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Trx-S-S + H_2O ออกมา จากนั้น dADP จะถูกเปลี่ยนเป็น deoxy-adenosinemonophosphate (dAMP) โดยเอนไซม์ ADEK และในขั้นตอนสุดท้าย dAMP ที่เกิดขึ้นก็จะถูกเปลี่ยนเป็นดีออกซีอะดีโนซีน (deoxyadenosine) หรือสารคอร์ไดเซปิน โดยเอนไซม์ NT5E ดังภาพ 9



ภาพ 9 วิถีการสังเคราะห์สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน

ที่มา: Zheng et al., 2011, pp. 1-21

2. วิธีการตรวจวัดหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี หรือการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูง เช่น เครื่อง HPTLC (High-performance thin-layer chromatography) เครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography) เครื่อง LC-MS (Liquid Chromatography-Mass spectrometer) หรือเครื่อง GS-MS (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer) เป็นต้น ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยส่วนใหญ่

แล้วสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินจะตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Zhao et al., 2014, pp. 271-289) โดยเครื่อง HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจ ที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจ จะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเฟสที่อยู่กับที่ โดยสารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดี กับเฟสที่เคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า "โครมาโทแกรม" (chromatogram) โดยแต่ละพีคจะมีปริมาณพื้นที่ใต้กราฟแสดงผลออกมาเพื่อนำไปใช้คำนวณวิเคราะห์หาสารที่ต้องการกับสารมาตรฐานต่อไป

3. **ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย** (ดูภาพ 10 ประกอบ)

3.1 Mobile phase / Solvent: หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่างเป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

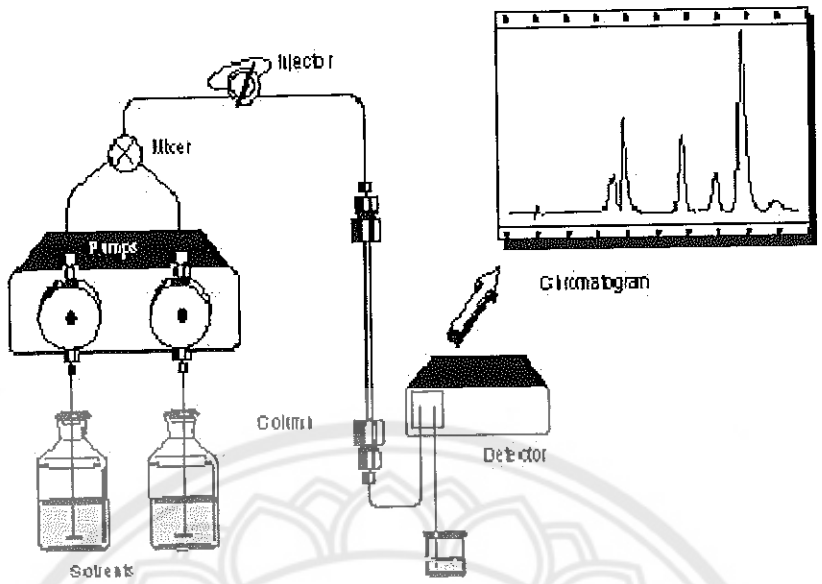
3.2 Degaser: ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector

3.3 Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

3.4 Injector/ Autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

3.5 Column: หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase

3.6 Detector: คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี



ภาพ 10 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

4. ขั้นตอนการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน (Huang et al., 2009, pp. 957-961)

4.1 การเตรียมสารสัดหยาบ (crude extract) นำเห็ดถั่งเช่ามาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำเห็ดแห้งบดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 50% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่อง vertex หลังจากนั้นนำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 9,900 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนที่ใสซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ เก็บใส่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 °C เพื่อเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

4.2 การฉีดสารสกัดหยาบเข้าสู่เครื่อง HPLC โดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นอุลตราไวโอเล็ต (UV) กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร โดยมีสภาวะที่ใช้สำหรับแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำและสารละลายเมทานอลในอัตราส่วน 90:10 (V/V) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์เท่ากับ 35 °C

4.3 นำปริมาณพื้นที่ใต้กราฟที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณหาสารที่ต้องการจากการสร้างสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินที่วัดได้จะมีปริมาณมากน้อยต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างในการเพาะเลี้ยง เช่น สายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อม ปัจจุบันองค์การอาหารและยาประเทศไทย ยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานที่ชัดเจนของสารดังกล่าวว่าควรอยู่ที่ปริมาณท่าใด อาจมีเพียงการกำหนดขึ้นเองในส่วนของผู้ประกอบการเพื่อนำมาใช้เป็นตัวกำหนดราคาของสินค้าและใช้เพื่อประกอบการโฆษณาสินค้า โดยถ้าสินค้าเห็ดถั่งเช่ามีปริมาณสารสูงมากเท่าไรก็แสดงให้เห็นว่าสินค้ามีคุณภาพดีและมีราคาสูงตามไปด้วย สำหรับตลาดเห็ดถั่งเช่าสีทองในประเทศไทย โดยทั่วไปแล้วเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีการจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดจะมีปริมาณสารอะดีโนซีนตั้งแต่ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) ขึ้นไป ส่วนสารคอร์ไดเซปินจะมีมากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นไป จึงจะสามารถเป็นที่ยอมรับในตลาดถั่งเช่าสีทองได้ ดังนั้นแต่ละฟาร์มที่เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าก็จะมีการพัฒนาสูตรของตัวเองในการเพาะเลี้ยงเพื่อทำให้ได้ผลผลิตที่ดีและมีปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินสูงสุด

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near infrared spectroscopy หรือ NIRs)

1. **ทฤษฎีของสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้**

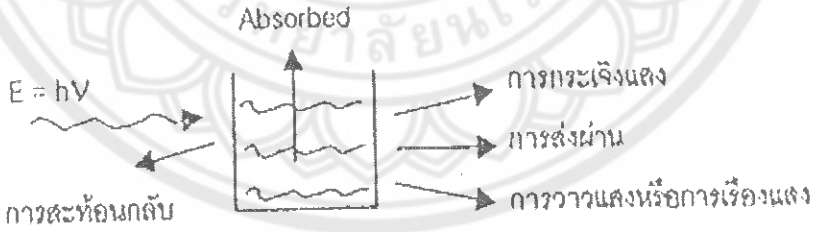
การค้นพบรังสีย่านอินฟราเรด (Infrared radiation) เกิดขึ้นเมื่อ ปี ค.ศ.1800 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อว่า Sir William Herschel ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับผลกระทบของความร้อน (heating effect) ในช่วงความยาวคลื่น ต่างๆ ของแถบสเปกตรัมที่เกิดจากการแยกแสงด้วยแท่งปริซึม จากการทดลองพบว่า ผลกระทบของความร้อนเกิดขึ้นสูงสุดในแถบแสงที่อยู่ถัดไปจากแสงสีแดง (red end) แต่ไม่สามารถมองเห็นสเปกตรัม (spectrum) ได้ จึงเรียกช่วงรังสีที่ค้นพบว่ารังสีย่านอินฟราเรด (infrared radiation) ถือเป็นการค้นพบที่ยิ่งใหญ่เพราะรังสีอินฟราเรดประกอบไปด้วยสามช่วงความยาวคลื่นที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้แตกต่างกัน หนึ่งในนั้นก็คือช่วงรังสีอินฟราเรดย่านใกล้หรือสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2555)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near infrared spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการอันตรกิริยา (interaction) เมื่อแสงใกล้อินฟราเรด (Near infrared) ซึ่งเป็นคลื่นแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 700-2500 นาโนเมตร ส่องไปยังสิ่งที่เราต้องการวิเคราะห์ (สารอินทรีย์ เช่น อาหาร หรือวัตถุดิบทางอาหาร) เพื่อให้เกิดการดูดกลืนแสงแล้วมีการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการสั่นสะเทือนของพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนกับไฮโดรเจน (C-H),

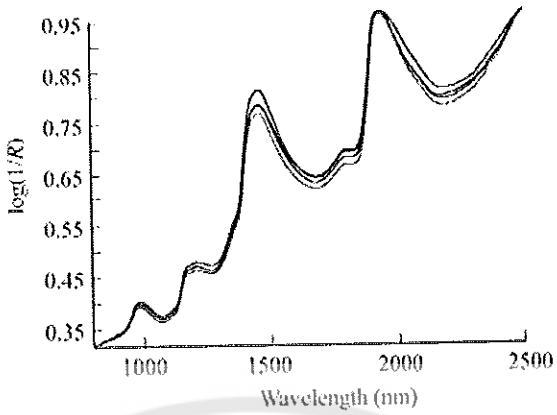
ไนโตรเจนกับไฮโดรเจน (N-H) และออกซิเจนกับไฮโดรเจน (O-H) โดยเกิดการยืด-หด หรือบิด-งอในรูปแบบต่างๆ โดยการเปลี่ยนระดับพลังงานข้ามขั้นมากกว่า 1 ขั้น (overtone) หรือเกิดจากการสั่นสะเทือนข้าม 1 ขั้น (fundamental vibration) พร้อมกันของพันธะตั้งแต่ 2 พันธะขึ้นไป ทำให้ได้ผลรวมของการสั่น (combination vibration) ในการสั่นของพันธะต่างๆ จะเกิดขึ้นที่ช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกันไปซึ่งเป็นค่าเฉพาะของแต่ละหมู่ฟังก์ชัน ดังนั้นเมื่อโมเลกุลได้รับรังสีอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นตรงกับพันธะในโมเลกุลจะเกิดการสั่นและดูดกลืนรังสีไว้ทำให้มีพลังงานมากกว่าปกติจากเดิมที่โมเลกุลอยู่ในสภาวะพื้น (ground vibration level) เมื่อได้รับพลังงานเพิ่มขึ้นจะอยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited vibration level) อย่างไรก็ตามเมื่อโมเลกุลกลับสู่สภาวะพื้นก็จะปล่อยพลังงานที่รับเพิ่มเข้าไปออกมาในรูปพลังงานความร้อน

2. **หลักการพื้นฐานของเครื่อง** Near Infrared Spectroscopy

หลักการของสเปกโทรสโครสปี คือ เมื่อลำแสงของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าผ่านเข้าไปยังสารละลายหรือวัตถุ จะมีแสงบางส่วนที่จะถูกดูดกลืน (absorbed) บางส่วนผ่านทะลุออกไป (transmitted) บางส่วนเกิดการสะท้อนกลับ (reflected) บางส่วนเกิดการวาวแสงหรือการเรืองแสง (fluorescence or phosphorescence) และบางส่วนอาจเกิดการกระเจิงแสง (scattered) ดังภาพ 11 ทำการตรวจวัดคลื่นแสงที่ไม่ถูกดูดกลืน ซึ่งสะท้อนหรือส่องผ่านออกมา โดยสามารถตรวจวัดด้วย Detector แล้วประมวลผลเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ เกิดเป็นสเปคตรัมที่มีลักษณะเฉพาะตัวในแต่ละตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2555) ดังภาพ 12



ภาพ 11 การกระทำของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ากับสารต่างๆ



ภาพ 12 ลักษณะของสเปกตรัมของตัวอย่างที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ

ปริมาณการดูดกลืนพลังงานแสงเป็นไปตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert) พลังงานของคลื่นแสงเมื่อผ่านเข้าไปในตัวอย่างจะถูกดูดกลืนไว้โดยองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างความเข้มข้นของแสงที่ผ่านออกมาโดยทั่วไปจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีนั้น (Osborne, Fearn, & Hindle, 1993)

2.1 **กฎของแลมเบิร์ต** (Lambert's law) กล่าวว่า เมื่อแสงสีเดียวหรือแสงความยาวคลื่น เดียวผ่านตัวกลางเนื้อเดียว (homogeneous) สัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้จะมีค่าแปรผันตรงกับความหนาของตัวกลางนั้น สามารถเขียนในรูปสมการได้ ดังนี้ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2555)

$$\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon b$$

เมื่อ I คือ ความเข้มของแสงความยาวคลื่นเดียว

ε คือ สัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงปกติเปลี่ยนแปลงตามความยาวคลื่นและอุณหภูมิ

I_0 คือ ความเข้มของแสงก่อนผ่านตัวกลาง เมื่อ $b = 0$

b คือ ความหนาของตัวกลางในหน่วย เซนติเมตร

จากสมการจะเห็นได้ว่าแสงในแต่ละความยาวคลื่น เมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเนื้อ เดียวกันแล้วความเข้มของแสงจะลดลงเป็นแบบ Exponential กับความหนาของตัวกลางนั้นๆ

2.2 **กฎของเบียร์** (Beer's law) กล่าวว่า เมื่อแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งผ่านตัวกลางเนื้อเดียว สัดส่วนของความเข้มแสงที่ถูกตัวกลางนั้นดูดกลืนไว้จะแปรโดยตรงกับค่าความเข้มข้นของสารตัวกลางนั้น สามารถเขียนในรูปสมการได้ ดังนี้

$$\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon bc$$

$$A = \varepsilon bc$$

เมื่อ c คือ ความเข้มข้นของสารในหน่วย โมลต่อลิตร

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

จากสมการจะเห็นได้ว่าแสงในแต่ละความยาวคลื่นเมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วความเข้มของแสงจะลดลงแบบ Exponential กับความหนาและความเข้มข้นของตัวกลางนั้นๆ การดูดกลืนแสงย่านใกล้อินฟราเรดของโมเลกุลสารอินทรีย์ ช่วงคลื่นอินฟราเรดสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 ช่วง ดังตาราง 4

ตาราง 4 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด

ช่วงคลื่น	ช่วงความยาวคลื่น (nm)	Wave number (cm^{-1})
Region I อินฟราเรดย่านใกล้ (Near IR)	800-1100	12500-9000
Region II อินฟราเรดย่านกลาง (Mid IR)	1200-1800	8500-5500
Region III อินฟราเรดย่านไกล (Far IR)	1800-2500	5500-4000

ที่มา: นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์, 2542

Region I จะพบโอเวอร์โทนที่สองและสาม (2^{nd} and 3^{rd} overtones) และการสั่นรวม (Combination mode) สำหรับการสั่นแบบยืด (Stretching vibration) ของหมู่ฟังก์ชัน X-H, X=C, O, N

Region II จะพบโอเวอร์โทนที่หนึ่งและการสั่นรวมหลากหลายแบบในการสั่นแบบยืด (Stretching vibration) ของ X-H

Region III ส่วนมากจะปรากฏการสั่นรวม (Combination mode)

3. เทคนิคในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

เป็นการจัดวางตัวอย่างเพื่อให้ได้สเปกตรัมที่สัมพันธ์กับปริมาณค่าทางเคมีที่สนใจ โดยใช้เทคนิค NIR ได้แก่ (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2545, น. 131-151)

3.1 Transmittance เป็นการวัดปริมาณแสงที่ส่องผ่านออกมาในด้านตรงกันข้ามกับด้านที่แสงตกกระทบ

3.2 Reflection แสงตกกระทบที่พื้นผิวของตัวอย่าง วัดปริมาณแสงที่สะท้อนออกมา โดยรวมถึงแสงที่สะท้อนจากเนื้อตัวอย่างส่วนที่ใกล้ผิวตัวอย่างได้อีกด้วย

3.3 Transflection แสงจากแหล่งกำเนิดแสงตกกระทบตัวอย่าง ผ่านตัวอย่างลงไปตกกระทบแผ่นเซรามิก ทอง หรือ อะลูมิเนียมในชั้นใต้สุด แล้วสะท้อนออกมายัง Detector

3.4 Interaction ใช้ในกรณี Fiber Optics Probe แสงจากแหล่งกำเนิดแสงย่าน NIR ส่องผ่านลงมายังตัวอย่างในวงแหวนด้านนอก แล้วแสงที่สะท้อนออกมาจากเนื้อตัวอย่างถูกส่งไปยัง Detector บริเวณส่วนกลาง Fiber Optics

4. ขั้นตอนในการวิเคราะห์ข้อมูล Near infrared spectra (NIRs)

รณฤทธิ์ ฤทธิรณ (2555) ได้อธิบายขั้นตอนการนำ NIRS ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ของตัวอย่างที่ต้องการ ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอน 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการสร้างสมการที่ใช้ทำนาย (Calibration set) และขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของสมการที่สร้างขึ้นมา (Validation set) ในการสร้างสมการที่ใช้ทำนายก็เพื่อให้ได้สมการมาตรฐานที่ใช้ในการทำนายค่าคุณลักษณะคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ต้องการทราบ โดยจะเริ่มจากการวัดการดูดกลืนพลังงานย่าน NIR ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นต่างๆ หรือสเปกตรัมของตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างนั้นมาวิเคราะห์ค่าทางเคมี และหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าทางเคมี เมื่อได้สมการมาตรฐานแล้วต้องมีการนำสมการมาตรฐานที่ได้จากการทำ Calibration มาตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการมาตรฐานในการทำนายค่าคุณภาพ ซึ่งขั้นตอนนี้เรียกว่า การทำ Validation เพื่อทดสอบสมการที่ได้ว่ามีความแม่นยำหรือไม่เมื่อได้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ แล้วจึงนำสมการที่ได้ไปใช้ทำนายค่าคุณลักษณะที่ต้องการศึกษาจากสเปกตรัม NIRs ที่ทำการวัดมาได้ ซึ่งใน 2 ขั้นตอนหลักที่กล่าวมานั้น ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ (รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555 อ้างถึงใน นภัสภรณ์ ตั้งจิตวิบูลย์กุล, 2558)

ขั้นตอนที่ 1 กำหนดแหล่งความแปรปรวนของตัวอย่าง

เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด กลุ่มตัวอย่างที่ดีจะต้องมีจำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์อย่างพอเพียงทั้งตัวอย่างในปัจจุบันและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ในอนาคต โดยเฉพาะปริมาณองค์ประกอบทางเคมีจะต้องมีค่าครอบคลุมปริมาณทั้งต่ำสุดและสูงสุดของตัวอย่าง โดยมีการสุ่มตัวอย่าง (Sampling) ที่ถูกต้องเพียงพอและเป็นตัวแทนที่ของประชากร การสุ่มตัวอย่างถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการที่จะได้สมการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ดี ทำให้ค่าผิดพลาดที่ได้จากการทดลองลดลง

ขั้นตอนที่ 2 กำหนดวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

ค่าทางเคมีของตัวอย่างจะต้องถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีที่น่าเชื่อถือ วิธีวิเคราะห์ทางเคมีที่นิยมใช้ มักเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่มีเลขวิธีอ้างอิงของ AACC, AOAC, ISO เป็นต้น แต่วิธีวิเคราะห์ทางเคมีบางวิธีอาจยังไม่เป็นมาตรฐาน หรือผู้ใช้พัฒนาขึ้นเอง แต่หากมีการใช้กันแพร่หลายก็สามารถนำมาใช้ได้ โดยวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวต้องสามารถทำซ้ำได้ และค่าที่วิเคราะห์ได้ต้องคงที่สม่ำเสมอ

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจสอบความแม่นยำวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ขั้นตอนนี้อาจข้ามไปได้ การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้ในขั้นตอนที่ 2 มีข้อดีอยู่ 2 ประการ

1. ตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้โดยผู้ปฏิบัติการและเครื่องมือในห้องปฏิบัติการที่กำหนด ซึ่งมักจะแสดงด้วยค่าผิดพลาดมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Standard Error of Laboratory; SEL) ค่า SEL นี้ จะแสดงการเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ยของค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ผู้ใช้กำหนด โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$SEL = \left[\frac{\sum_i\left(\sum_j\left(x_{ij}-x_i\right)^2/(R-1)\right)}{N}\right]^{0.5}$$

x_i	คือ	ค่าเฉลี่ยของค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ของตัวอย่าง i
x_{ij}	คือ	ค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ของการวิเคราะห์ซ้ำที่ j ของตัวอย่าง i
R	คือ	จำนวนครั้งของการวิเคราะห์ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง
N	คือ	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ

หากผู้ปฏิบัติการวิเคราะห์ค่าทางเคมี 2 ซ้ำ เพื่อให้ค่า SEL ถูกต้องมากขึ้นจะใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$SEL = \left[\frac{\sum_i (x_1 - x_2)^2}{N}\right]^{0.5}$$

$x_1 - x_2$ คือ ผลต่างระหว่างค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ซ้ำของตัวอย่าง

2. กำหนดค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนาย (standard Error of Prediction; SEP) เทคนิค NIR เป็นวิธีวิเคราะห์ทางอ้อมจากสมการแคลิเบรชั่นที่ได้จากการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าทางเคมี ดังนั้น ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีจะเป็นตัวแปรสำคัญในการกำหนดความแม่นยำของเทคนิค NIR หรือค่า SEL ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีสามารถกำหนดค่า SEP ได้ Shenk et al. (1992, pp. 383-431) ได้อธิบายการประเมินผลของค่า SEP เมื่อเทียบกับค่า SEL ดังตาราง 5

ตาราง 5 ขอบเขตการประเมินผลค่า SEP เมื่อเทียบกับค่า SEL

ค่า SEP	การประเมินความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่น
SEP = 1-1.5 SEL	ความแม่นยำดีเลิศ
SEP = 2-3 SEL	ความแม่นยำดี
SEP = 4 SEL	ความแม่นยำปานกลาง
SEP = 5 SEL	ความแม่นยำต่ำ

ที่มา: รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555

ขั้นตอนที่ 4 กำหนดวิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่างต้องมีความสม่ำเสมอ เนื่องจากปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสเปกตรัมโดยทั่วไป คือ ขนาดอนุภาค ความชื้น อุณหภูมิ ขนาดความหนาของเซลล์ใส่ตัวอย่าง เป็นต้น ดังนั้นต้องพยายามควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้คงที่มากที่สุด การกำหนดเซลล์ใส่ตัวอย่างสำหรับวัดสเปกตรัม การควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้คงที่ โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากการดูดกลืนพลังงานย่าน NIR ของน้ำแปรผันตามอุณหภูมิ เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 5 กำหนดระบบการวัดสเปกตรัม

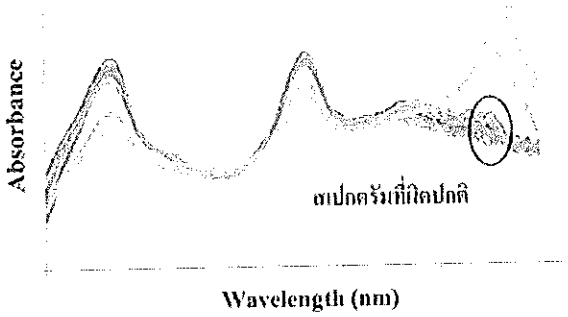
เนื่องจากเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ย่านใกล้อินฟราเรดมีหลายชนิด ดังนั้นควรเริ่มตั้งแต่การกำหนดชนิดของเครื่อง และกำหนดวิธีการวัด เช่น การสะท้อนกลับ (reflection) การส่องผ่าน (transmission) การใช้หัววัดแบบใยแก้วนำแสงของวิธีอินเตอร์แอกชัน (interaction) หรือการวัดสารละลายของวิธีการส่องผ่าน-สะท้อนกลับหรือทรานสเฟลกชั่น (transflection) เป็นต้น ควรเลือกให้เหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่าง และตำแหน่งค่าทางเคมีในตัวอย่าง นอกจากนี้ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ก็มีความสำคัญ โดยทั่วไปช่วงความยาวคลื่นสั้นจะประมาณ 700-1000 นาโนเมตร จะสามารถส่องทะลุได้ลึกประมาณ 5-10 มิลลิเมตร และมักจะใช้กับตัวอย่างที่มีความชื้นหรือปริมาณน้ำมาก เนื่องจากในย่านนี้องค์ประกอบทางเคมีจะมีความสามารถในการดูดกลืนพลังงานย่านใกล้อินฟราเรดต่ำ สำหรับความยาวคลื่นยาวจะมีช่วงความยาวคลื่นประมาณ 1000-2500 นาโนเมตร จะสามารถทะลุได้ลึกประมาณ 2-5 มิลลิเมตร และมักจะใช้กับตัวอย่างที่มีความชื้นต่ำ เนื่องจากในย่านนี้ องค์ประกอบางเคมีจะมีความสามารถในการดูดกลืนพลังงานย่านใกล้อินฟราเรดสูง สำหรับอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างควรเลือกให้เหมาะสมกับลักษณะตัวอย่าง เช่น ตัวอย่างที่เป็นผง เม็ดละเอียด ตัวอย่างที่เป็นสารละลาย ตัวอย่างที่ข้นเหนียวหนืด เมล็ดเดี่ยว เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 6 เตรียมตัวอย่าง และเอกสารรายชื่อ

ตั้งชื่อตัวอย่างพร้อมจดรายชื่อในตารางเก็บข้อมูล (data sheet) สำหรับใส่ค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างนั้นๆ จำนวนตัวอย่างที่แนะนำควรมีขั้นต่ำ 100 ตัวอย่างจึงจะสามารถแยกตัวอย่างเป็นสองกลุ่มอิสระจากกัน กลุ่มที่หนึ่งจะใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชั่น (calibration sample set) และอีกกลุ่มหนึ่งใช้ในการทดสอบความแม่นยำของสมการหรือกลุ่มแวลิเดชั่น (validation sample set) อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 7 วัดสเปกตรัมของตัวอย่าง

ให้กำหนดขั้นตอนในการใส่ตัวอย่างเพื่อให้เกิดความสม่ำเสมอ และมีความผิดพลาดในการวัดสเปกตรัมน้อยที่สุด ควรคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ เช่น ปริมาณของตัวอย่างในอุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง ความอัดตัวหรือความหนาแน่นของตัวอย่างในอุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง เป็นต้น นอกจากนี้ควรตรวจดูความผิดปกติของสเปกตรัมบนจอแสดงผลที่อาจเกิดขึ้นในขณะวัดสเปกตรัมได้ เช่นวางตัวอย่างไม่ถูกต้อง แรงดันไฟฟ้าไม่สม่ำเสมอ มีแสงจากภายนอกรบกวน มีสัญญาณรบกวน ดังภาพ 13 หากตรวจพบควรลบสเปกตรัมนั้นและใส่ตัวอย่างใหม่ เพื่อวัดสเปกตรัมใหม่อีกครั้ง



ภาพ 13 สเปกตรัมผิดปกติ สามารถสังเกตได้ในขณะวัดสเปกตรัม

ขั้นตอนที่ 8 การเลือกตัวอย่างตามลักษณะสเปกตรัม

ขั้นตอนนี้อาจข้ามไปได้ การเลือกตัวอย่างมีสมมุติฐานว่า สเปกตรัมของตัวอย่างที่มีความแปรปรวนต่างกันจะมีการดูดกลืนต่างกัน ดังนั้น เราสามารถเลือกตัวอย่างที่มีความแปรปรวนหลากหลายไม่ซ้ำกันได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป ข้อควรระวังสำหรับการเลือกตัวอย่างจากสเปกตรัม คือ ไม่ควรดูจากสเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) ที่เก็บไว้

ขั้นตอนที่ 9 วิเคราะห์ค่าทางเคมี

ให้ทำตามวิธีการที่กำหนดไว้ในขั้นตอนที่ 2 เนื่องจากความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่นจะขึ้นตรงกับความแม่นยำของการวิเคราะห์ทางเคมี ดังนั้นต้องให้ความสำคัญกับความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ หากเกิดความผิดพลาดหรือข้อสงสัย ให้ตัดค่าเหล่านั้นก่อนนำไปสร้างสมการแคลิเบรชั่น ข้อควรระวังสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี คือ การเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีภายหลังการวัดสเปกตรัม หากมีการเปลี่ยนแปลงรวดเร็วจะต้องวางแผนการวิเคราะห์ทันทีภายหลังการวัดสเปกตรัม เนื่องจากสเปกตรัมของตัวอย่างที่เราวัดนั้นจะต้องสะท้อนปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ณ เวลานั้นเช่นกัน

ขั้นตอนที่ 10 บันทึกค่าทางเคมี

ค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ได้จะต้องนำมาใส่ให้ถูกต้องสอดคล้องกับสเปกตรัมของตัวอย่าง ขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก บ่อยครั้งที่พบปัญหาใส่ค่าทางเคมีผิด หรือไม่ถูกต้องกับสเปกตรัม และหากมีตัวอย่างมากก็จะตรวจสอบได้ยาก ดังนั้นควรตรวจสอบความถูกต้องเป็นระยะหรือหลังบันทึกค่าทางเคมี ก่อนการสร้างสมการแคลิเบรชั่น

ขั้นตอนที่ 11 ตรวจสอบข้อมูลผิดปกติ (Outliers)

การตรวจดูความผิดปกติของสเปกตรัมเริ่มต้น (original spectrum) หากพบบางเส้นอยู่ในตำแหน่งผิดปกติจากกลุ่ม ให้จดบันทึกและพิจารณาตัด หรือทำการตรวจสอบพิสัยของค่าทางเคมี เป็นการตรวจสอบการกระจายค่าทางเคมีของประชากรกลุ่มตัวอย่าง หากตัวอย่างมีค่าทางเคมีสูงหรือต่ำจากการกระจายค่าทางเคมีแบบปกติ (normal distribution) ตัวอย่างเหล่านั้นอาจไม่อยู่ในกลุ่มประชากรที่สนใจ

ขั้นตอนที่ 12 เลือกตัวอย่างตามค่าทางเคมี

ก่อนการสร้างสมการแคลิเบรชั่น หากมีจำนวนตัวอย่างมากกว่า 100 ตัวอย่าง โดยทั่วไปจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการแคลิเบรชั่น หรือกลุ่มตัวอย่างแคลิเบรชั่น (Calibration sample set) และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่นหรือกลุ่มตัวอย่างแวลิเดชั่น (Validation sample set) โดยมีแนวทางที่สำคัญ คือ พิสัยค่าทางเคมีของตัวอย่างในกลุ่มแคลิเบรชั่นต้องกว้างเพียงพอ ครอบคลุมตัวอย่างในกลุ่มแวลิเดชั่นและต้องมีจำนวนมากกว่า

เทคนิคการแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

1. แบ่งกลุ่มตัวอย่างด้วยการเรียงลำดับค่าทางเคมีจากน้อยไปมาก (odd-even sort)

2. กำหนดตัวอย่างแรก (หรือสองตัวอย่างแรก) และตัวอย่างสุดท้าย (หรือสองตัวอย่างสุดท้าย) เป็นตัวอย่างในกลุ่มแคลิเบรชั่น ตัวอย่างที่เหลือจะสลับตามสัดส่วนที่ต้องการ เช่น 1 : 1 ก็จะสลับกลุ่มตัวอย่างที่ละหนึ่งดังตาราง 6 หากต้องการสัดส่วนเป็น 3 : 2 ก็จะกำหนดตัวอย่างในกลุ่มแคลิเบรชั่น 3 ตัวอย่าง และกลุ่มแวลิเดชั่น 2 ตัวอย่าง กำหนดอย่างนี้เรื่อยไปจนครบ

ตาราง 6 การเลือกตัวอย่างและจัดกลุ่มตัวอย่างตามค่าทางเคมีแบบสลับหนึ่งต่อหนึ่ง

กลุ่มตัวอย่าง	ตัวอย่างที่	ค่าโปรตีน (%)
Calibration sample set	25	7.0
Validation sample set	30	7.5
Calibration sample set	35	8.0
Validation sample set	63	8.3
Calibration sample set	17	8.7
Validation sample set	5	9.0
Calibration sample set	27	9.3
...	33	9.4

ที่มา: รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555

ขั้นตอนที่ 13 การปรับแต่งสเปกตรัม

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของสเปกตรัมได้แก่ ความชื้น และขนาดอนุภาค (partial size) ซึ่งจะทำให้สเปกตรัมที่ได้มีความแตกต่างกันอันเนื่องมาจากการกระเจิงแสง และความแตกต่างที่เป็นผลมาจากความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ต้องการวัด ซึ่งอาจจะทำให้เกิดความแตกต่างในผลเชิงบวก (Additive Scattering) ทำให้สเปกตรัมเพิ่มขึ้นตามตลอดช่วงความยาวคลื่น หรือผลเชิงคูณ (Multiplicative scattering) สเปกตรัมเพิ่มขึ้นตามความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงต้องนำไปปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์ก่อนเพื่อลดความคลาดเคลื่อนให้น้อยลง วิธีที่ใช้ในการปรับแต่งสเปกตรัมมีหลายวิธี ตัวอย่างเช่น

1. First derivative เป็นการหาความชันของสเปกตรัม ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาที่ สเปกตรัมมีค่าเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่น (การเลื่อนตัวของสเปกตรัมตามแกน Y) เนื่องจากอิทธิพลของความชื้น และขนาดอนุภาค การทำ First derivative จุดยอดของ สเปกตรัมเริ่มต้นจะเป็นจุดที่มีความชันมากที่สุด ซึ่งทำให้การแปลความหมายยาก

2. Second derivative จะเป็นการเปลี่ยนแปลงความชันของสเปกตรัม โดยสเปกตรัมที่ได้จะมีรูปร่างที่แตกต่างจากสเปกตรัมเริ่มต้น การหาการเปลี่ยนแปลงของความชันสามารถแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันอยู่ สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี Second derivative ที่ได้จะมีจุดยอดที่เป็นบวกในด้านซ้ายและด้านขวา ส่วนจุดยอดตรงกลางจะอยู่ตรงด้านข้ามที่มีค่ามากที่สุดและ

ตรงกับจุดยอดเริ่มต้น การคำนวณการเปลี่ยนแปลงความชันของสเปกตรัมสามารถแยกจุดยอดของสเปกตรัมที่เหลื่อมซ้อนกันของสเปกตรัมเริ่มต้นได้ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Second derivative จึงเป็นที่นิยมมากกว่าวิธี First derivative

3. Multiplicative scatter correction (MSC) เสเปกตรัมที่ได้จากการวัดการดูดกลืนย่านแสง NIRs แบบ Diffuse reflectance และแบบ Transmission มักจะเกิดการกระเจิงแสง (scatter light) ดังนั้น ได้มีการใช้วิธีทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า MSC มาปรับแต่งสเปกตรัม เป็นการหาค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งสเปกตรัมเพื่อลดอิทธิพลของการกระเจิงของแสง ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการลดค่าผิดพลาด

4. วิธี Smoothing เป็นการหาค่าเฉลี่ยคลื่นโดยมีการแทนค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความยาวคลื่นด้วยค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่มีจุดศูนย์กลางของช่วงความยาวคลื่นตรงกับจุดที่ถูกแทนที่ ต่อจากนั้นเลื่อนช่วงไปหนึ่งความยาวคลื่น แล้วคำนวณซ้ำจนครบตลอดช่วงความยาวคลื่น ซึ่งสามารถลดปัญหาของสัญญาณรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสงโดยจะได้สเปกตรัมที่มีลักษณะเหมือนสเปกตรัมดั้งเดิมแต่จะเรียบสม่ำเสมอมากกว่า (Siesler et al., 2002)

5. Constant offset elimination (COE) เป็นการลบโดยค่าคงที่ โดยสเปกตรัมจะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุด คือ มีค่าเท่ากับศูนย์ การใช้งานวิธีนี้เป็นการกำจัดปัญหาการขยับขึ้นของเบสไลน์ (baseline shift) เชิงเส้น สิ่งเหล่านี้เกิดจากค่าที่แตกต่างกันของการขยายสัญญาณของดีเทคเตอร์ (detector amplification) (Tripathi, & Mishra, 2009, pp. 840-846; Hassan et al., 2015, pp. 109-117)

6. Vector normalization (NV) โดยขั้นแรกสเปกตรัมจะถูกหาค่ากลาง จากนั้นผลรวมของค่ายกกำลังสองของค่า Y ทั้งหมดจะถูกคำนวณ และสเปกตรัมใดๆ จะถูกหารด้วยค่ารากที่สองของผลรวมนี้ สิ่งที่เรียกว่า Vector norm ของสเปกตรัมที่ได้จะเท่ากับ 1 เสมอ การใช้งานในหลักการสเปกตรัมจะประกอบด้วยสองส่วนของข้อมูล คือ ความสูงของแถบการดูดซับและโครงสร้าง หลังจากการนอร์มัลไลเซชั่น (normalization) ข้อมูลความสูงจะหายไปมีเพียงโครงสร้าง ข้อมูลยังคงอยู่ การ normalization ถูกใช้เพื่อการกำจัดผลกระทบของเส้นทางผ่านเชิงแสง (optical path length) ที่แตกต่างกัน ในกรณีของการวัดแบบส่องผ่าน ความยาวของเส้นทางผ่านเชิงแสงทำให้ความสูงของสัญญาณเปลี่ยนแปลง แต่โครงสร้างยังเหมือนเดิม ในทำนองเดียวกันการวัดแบบสะท้อนแบบแพร่จะมีผลกระทบของการรบกวนเนื่องจากความหนาแน่นของวัสดุแตกต่างกันหรือ

ขนาดอนุภาคแตกต่างกัน สิ่งเหล่านี้ก็จะลดลง (Tripathi, & Mishra, 2009, pp. 840-846; Hassan et al., 2015, pp. 109-117)

7. Min-max-normalization (สำหรับสเปกตรัมการดูดซับคลื่น) สเปกตรัมจะถูกขยับเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุดมีค่าเท่ากับศูนย์ แล้วสเปกตรัมจะถูกขยายเพื่อให้ค่า Y สูงสุดเท่ากับสองหน่วยของการดูดซับคลื่นการใช้งาน เทียบได้กับ Vector normalization

ขั้นตอนที่ 14 วิธีการสร้างสมการ (Calibration equation)

สมการ Calibration ประกอบไปด้วยด้วยตัวแปร 2 ชนิด คือ ตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) การหาตัวแปรอิสระที่มีความสัมพันธ์กับค่าตัวแปรตามเป็นสิ่งสำคัญของการสร้างสมการ Calibration ซึ่งแบ่งได้ 2 วิธีหลัก คือ Wavelength selection และ Full spectrum method เนื่องจากลักษณะสเปกตรัมย่าน NIR โดยทั่วไปจะมีพีค (peak) ที่ซ้อนทับกัน (overlapping) และ board peak อยู่มาก ดังนั้นการสร้างสมการประเมินค่าทางเคมีที่พิจารณาเพียงความยาวคลื่นเดียวหรือความยาวคลื่นจำนวนน้อยๆ จะให้ผลการวิเคราะห์ได้ถูกต้องไม่เท่ากับการพิจารณาทั้งสเปกตรัม (full spectrum method) หรือช่วงของสเปกตรัม วิธีการพิจารณาเช่นนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น ซึ่งมี 2 วิธีที่นิยมใช้คือ

1. Principal component regression (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการลดจำนวนของตัวแปรอิสระ ในกรณีที่ตัวแปรอิสระมีจำนวนมาก การลดจำนวนของตัวแปร คือแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่เรียกว่า Factor หรือองค์ประกอบ Factor ที่สร้างขึ้นก็คือ ผลรวมของค่าสเปกตรัมทุกความยาวคลื่นที่น้ำหนักแตกต่างกัน Factor แรกจะถูกสร้างขึ้นมาให้สามารถอธิบายความแปรปรวนที่เหลือซึ่งจะทำให้ Factor แต่ละ Factor แทบไม่มีความสัมพันธ์ต่อกันซึ่งเป็นข้อดีสำหรับการวิเคราะห์ด้วย PCR เมื่อทำการหา Factor เรียบร้อยแล้ว นำFactor ที่ได้มาทำ Regression กับค่าทางเคมีโดยใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (Least square method) ก็จะได้ค่า Calibration coefficient

2. Partial least square regression (PLSR) วิธีจะคล้ายคลึงกับ PCR แต่จะต่างกันตรงที่วิธี PCR กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมจะเป็นอิสระจากกระบวนการทำสมการถดถอยของสมการ Calibration ซึ่งใน PLSR ทั้งสองกระบวนการจะถูกเชื่อมโยงเข้าไว้ด้วยกันโดยมีการนำค่าองค์ประกอบทางเคมีมาคิดรวมข้อมูลและเกี่ยวข้องกับการประเมินค่าทางเคมีทำให้ Factor ที่ได้จากวิธี PLSR สามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลและเกี่ยวข้องกับการประเมินค่าทางเคมีในเวลาเดียวกันสมการ Calibration ที่ได้จากวิธี PLSR จึงประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น

ขั้นตอนที่ 15 วิธีการทดสอบสมการ (Validation test)

หลังจากที่ได้สมการประเมินค่าทางเคมีที่สัมพันธ์กับปริมาณสิ่งที่ต้องการหามากที่สุดแล้ว จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของสมการนั้นก่อนนำไปใช้จริง การทดสอบสมการประเมินค่าทางเคมีมี 2 วิธีที่นิยมกันแพร่หลาย ได้แก่

1. Full Cross Validation เป็นการทดสอบสมการภายใน (internal validation) หมายถึง ตัวอย่างที่นำมาทดสอบสมการก็คือตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาใช้สร้างสมการประเมินค่าทางเคมีนั่นเอง โดยมีขั้นตอนการทดสอบ คือ

ขั้นแรก ตัดตัวอย่างที่ 1 ออกไปจากกลุ่ม Calibration แล้วนำตัวอย่างที่เหลือมาสร้างสมการ Calibration เมื่อได้สมการ Calibration แล้วนำมาประเมินค่าตัวอย่างที่ 1 ที่ตัดไปก่อนหน้า

ขั้นที่สอง ตัดตัวอย่างที่ 2 ออกไป นำตัวอย่างที่ 1 กลับเข้ามาในกลุ่ม Calibration รวมกับตัวอย่างอื่นๆ ที่เหลือเพื่อสร้างสมการ Calibration เมื่อได้สมการ Calibration นำมาประเมินค่าของตัวอย่างที่ 2 ทำซ้ำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งประเมินค่าของตัวอย่างครบทุกตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างแต่ละตัวจะถูกตัดออก 1 ครั้งเท่ากัน ทำการวัดผลโดยการดูค่า RMSECV (root mean square error of cross validation) เป็นการวัดค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการประเมินโดยใช้สมการ Calibration กับค่าที่วิเคราะห์ได้ (measured value or true value) ถ้ามีค่าแตกต่างน้อยแสดงว่าสมการ Calibration ใช้ทำการประเมินนั้นมีประสิทธิภาพให้ค่าที่สามารถยอมรับได้

2. Prediction Testing เป็นการทดสอบสมการภายนอก (external validation) โดยการเตรียม หรือนำตัวอย่างชุดใหม่มาทำการวิเคราะห์ในสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับชุดตัวอย่างมาตรฐาน เรียกชุดตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบสมการมาตรฐานนี้ว่า Testing set วิธีการเตรียมตัวอย่างก็ทำเช่นเดียวกับตัวอย่างมาตรฐานทุกขั้นตอน แต่จุดที่ต้องระวังคือปริมาณค่าทางเคมีที่เราจะหาใน Testing set จะต้องอยู่ภายในช่วงชุดมาตรฐาน หลังจากได้สเปกตรัมของชุดทดสอบก็นำไปหาปริมาณจากสมการประเมินค่าทางเคมี เช่น ค่าโปรตีนโดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Reference methods แทนด้วยข้อมูลชุด X และนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRs แล้วนำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสมการ Calibration แทนด้วยข้อมูลชุด Y นำผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมาพิจารณาเปรียบเทียบ โดยมีค่าทางสถิติที่ใช้วัดคือ SEP (Standard error of prediction) หรือ RMSEP (Root mean square error of prediction) และ bias ดังสมการ

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(y_i - x_i - Bias)^2}$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - x_i)^2}$$

$$Bias = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - x_i)$$

เมื่อ x_i คือ ค่าของตัวอย่าง i

X คือ ค่าเฉลี่ยของ x_i

y_i คือ ค่าการทำนายของตัวอย่าง i

y คือ ค่าเฉลี่ยของ yi

STD คือ ค่า standard deviation

n คือ จำนวนตัวอย่าง

4. ค่าทางสถิติที่ใช้ในการพิจารณาการสร้างสมการ

4.1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) คือ ค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) หากค่าที่คำนวณได้มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 หมายความว่า สมการที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ในการอธิบายค่าทำนายที่เกิดจากอิทธิพลของตัวแปรอิสระ (X) กับค่าแปรตาม (Y) ที่มีความสัมพันธ์กันมาก เกณฑ์การพิจารณายอมรับค่า R ดังตาราง 8

4.2 ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (standard error of calibration; SEC) คือ ค่าที่บอกถึงสมการที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้ในการทำนายต่อไปได้ดีหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

4.3 ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction; SEP) คือ ค่าที่บอกถึงการนำเอาสมการที่สร้างขึ้น มาทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากเครื่อง NIR มีความแม่นยำสูงหรือต่ำ ซึ่งถ้าค่าที่คำนวณได้มีค่าน้อย หมายความว่าสมการที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำสูง

4.4 ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (average of difference between actual value and NIR value; bias) คือ ค่าเฉลี่ยของการทำนายข้อมูลของตัวแปรตาม (Y) และค่าเฉลี่ยข้อมูลของตัวแปรอิสระ (X) มีความแตกต่างกันหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

ในการเลือกสมการแคลิเบรชั่น มีหลักโดยทั่วไป คือ มักเลือกสมการที่ให้ค่า R สูง ในขณะที่ค่า SEC, SEP และค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) ควรมีค่าต่ำ (Li, & He, 2010, pp. 651-661) ส่วนการประเมินผลความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นสามารถอธิบายได้จากค่าทางสถิติสัดส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมีและค่า SEP ซึ่งเรียกว่าค่า RPD (Ratio of standard error of performance to standard deviation) ของตัวอย่างในกลุ่มที่ใช้ในการทดสอบความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่นและค่าสถิติ R ดังตาราง 7 และ 8

ตาราง 7 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า RPD

ค่า RPD	การคัดแยกกลุ่มตัวอย่าง (classification)	การประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ
0.0-2.3	แย่มาก (very poor)	ไม่แนะนำให้ใช้ (Not recommended)
2.4-3.0	ไม่ดีพอ (poor)	การแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (very rough screening)
3.1-4.9	ปานกลาง (fair)	การแบ่งระดับปริมาณ (screening)
5.0-6.4	ดี (good)	การควบคุมคุณภาพ (quality control)
6.5-8.0	ดีมาก (very good)	การควบคุมกระบวนการ (process control)
8.1 ขึ้นไป	ยอดเยี่ยม (excellent)	ทุกงาน (any application)

ที่มา: รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555

ตาราง 8 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า R

ค่า R	ความสามารถของสมการแคลิเบรชั่น
± 0.5	ไม่ควรใช้ในการทำนาย (Not usable)
± 0.51 – 0.70	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ (poor correlation)
± 0.71 – 0.80	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (rough screening)
± 0.81 – 0.90	การทำนายเพื่อแบ่งระดับปริมาณ หรือ ประมาณค่าเบื้องต้น (screening)
± 0.91 – 0.95	การทำนายเพื่องานวิจัย (research) และงานทั่วไป
± 0.96 – 0.98	การทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance)
± 0.99 ขึ้นไป	ทุกงาน (any application)

ที่มา: รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555

สาเหตุที่ต้องใช้กลุ่มตัวอย่างใหม่สำหรับการทดสอบความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่น มีอยู่ 2 ประการ คือ

1. ตรวจสอบความแม่นยำของสมการแคลิเบรชั่น ในการนำไปใช้กับกลุ่มตัวอย่างใหม่ เพราะการวิเคราะห์การถดถอยจะพยายามสร้างสมการให้มีค่า R สูงสุด และค่า SEC ต่ำสุด ซึ่งอาจจะบังเอิญดีสำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการแคลิเบรชั่นเท่านั้น แต่อาจไม่ดีสำหรับกลุ่มตัวอย่างอื่น ประเมินเลือกสมการแคลิเบรชั่น หากสมการแคลิเบรชั่นที่พัฒนาขึ้นมีค่า R และค่า SEC ใกล้เคียงกัน

2. การตัดสินใจเลือกสมการแคลิเบรชั่นที่ถูกต้องอาจผิดพลาดได้ จึงต้องใช้กลุ่มตัวอย่างใหม่ในการทดสอบความแม่นยำ เพื่อให้ได้ค่าสถิติสำหรับการตัดสินใจเลือกสมการแคลิเบรชั่น คือ ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายหรือค่าไบแอส (bias) และค่า SEP

ความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายเป็นความผิดพลาดอย่างเป็นระบบ (systematic error) สามารถสรุปสาเหตุของความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายได้ 2 สาเหตุ คือ

1. การเปลี่ยนแปลงระบบที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิห้อง แหล่งกำเนิดแสง (light source) เครื่องบด อุปกรณ์ใส่ตัวอย่าง เป็นต้น

2. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิตัวอย่าง พันธุ์ แหล่ง/ที่มาของตัวอย่าง ฤดูกาล สูตรผลิต ตำรับ การแปรรูป คุณสมบัติทางกายภาพ เป็นต้น

ดังนั้น หากเกิดการเปลี่ยนแปลงข้างต้น หรือผู้ใช้สงสัยสมการแคลิเบรชั่นรู้จักความแปรปรวนของตัวอย่างหรือไม่ ให้ทดสอบโดยทำนายค่าทางเคมีของตัวอย่างด้วยสมการแคลิเบรชั่นที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้นเลือกตัวอย่างอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง (แนะนำ 20 ตัวอย่างขึ้นไป) ที่มีค่าทางเคมีครอบคลุมพิสัยค่าทางเคมีของตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชั่น จากนั้นนำตัวอย่างเหล่านั้นไปวิเคราะห์ค่าทางเคมีจริง และทำการเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายได้ด้วยสมการแคลิเบรชั่นดังตาราง 9

ตาราง 9 การคำนวณค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (Bias) ของสมการแคลิเบรชั่น

ตัวอย่างที่	ค่าทางเคมีจริง	ค่าทำนายจาก NIR	ความผิดพลาด
1	12.3	12.4	0.1
2	12.1	11.5	-0.6
3	14.2	14.7	0.5
...	...	...	...
30	10.9	10.5	-0.4
ค่าเฉลี่ย	15.3	15.2	-0.1

ที่มา: รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555

ค่าเฉลี่ยความผิดพลาดในการทำนาย คือ ความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายนั่นเอง หากทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าทางเคมีจริงกับค่าที่ทำนายได้จากสมการแคลิเบรชั่น (ดูรายละเอียดในขั้นตอนที่ 15) แล้ว พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ก็ให้นำค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายนั้นไปชดเชย เพิ่มหรือลดจากค่าที่ทำนายได้จากสมการแคลิเบรชั่นโดนตรง แต่หากไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผู้ใช้ควรเพิกเฉย ไม่ต้องปรับแก้ มิฉะนั้นอาจทำให้สมการแคลิเบรชั่นทำนายค่าทางเคมีตัวอย่างในอนาคตผิดพลาดได้

5. ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิค NIRS

5.1 เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง รวมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย

5.2 เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ประหยัดระยะเวลา เชื่อถือได้ และปลอดภัย

5.3 เป็นวิธีที่สามารถใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ และระยะยาว สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ อีกทั้งไม่ใช้สารเคมีในการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

5.4 ในการวัดสเปกตรัมแต่ละครั้งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายค่าต่างๆ ได้หลายค่าในเวลาเดียวกัน

6. ข้อจำกัดของการวัดค่าด้วยเครื่อง NIR

6.1 ข้อมูลการสะท้อนกลับของแสงขึ้นอยู่กับขนาดของตัวอย่าง รูปร่าง การบรรจุและความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง เนื่องจากถ้าตัวอย่างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะแตกต่างกันส่งผลให้ความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์ค่าต่ำลง

6.2 การรบกวนอันเนื่องมาจากกลุ่มไฮดรอกซิล (O-H) หรือมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความชื้นภายในตัวอย่าง ดังนั้นในการตรวจสอบต้องมีการควบคุมความชื้น เนื่องจากเมื่อความชื้นในตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงจะมีผลทำให้สเปกตรัมที่ได้แตกต่างไปจากเดิมด้วย

6.3 การตรวจสอบขึ้นกับอุณหภูมิในการวิเคราะห์ ถึงแม้ว่าเป็นตัวอย่างเดียวกันแต่ทำการวัดที่อุณหภูมิต่างกันก็อาจทำให้ได้สเปกตรัมที่แตกต่างกัน

6.4 ค่าใช้จ่ายของเครื่องสเปกโตรสโกปีมีราคาแพง ทั้งตัวเครื่อง NIR และอุปกรณ์ประกอบ เนื่องจากเครื่องมือมีการออกแบบมาโดยเฉพาะสำหรับงานแต่ละประเภท

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานการนำเทคนิค NIRS มาใช้ในการวิเคราะห์สารต่างๆ หลายชนิดในพืชผลด้านการเกษตร และเห็ดถั่งเช่าบางชนิด ตัวอย่างเช่น

รณฤทธิ์ ฤทธิรณ และคณะ (2551, น. 70-73) ได้ศึกษาระบบการทำนายคุณภาพปริมาณความหวานและปริมาณวิตามินซีแบบไม่ทำลายในผลฝรั่ง ด้วยเครื่อง NIR Spectrometer แบบพกพา พบว่า สามารถทำนายปริมาณความหวานได้อย่างแม่นยำ ด้วยค่า R เท่ากับ 0.94 ค่า SEP เท่ากับ 0.54% และ ค่าbias เท่ากับ -0.08% สำหรับการทำนายปริมาณวิตามินซีสามารถนำไปใช้ในการคัดแยกกลุ่มของผลฝรั่งในเบื้องต้นได้ ด้วยค่า R เท่ากับ 0.74 ค่า SEP เท่ากับ 0.20% และค่า bias เท่ากับ 0.03% โดยค่าที่ทำนายได้จากสมการทั้งสองไม่แตกต่างจากค่าจริงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

พิมพ์ใจ สีหะนาม และคณะ (2559, น. 94-101) ได้ศึกษาความสามารถของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการทำนายปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในผลเสาวรสแบบไม่ทำลาย โดยนำผลเสาวรสสดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นสั้นของเนียร์อินฟราเรด (800-1100 นาโนเมตร) ด้วยระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (interactance) แล้วคำนวณสมการเทียบมาตรฐานโดยใช้วิธี PLSR เมื่อนำสมการเทียบมาตรฐานมาใช้ทำนายปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในผลเสาวรสชุดทดสอบสมการ พบว่า ค่า R ของค่าที่ทำนายได้และค่าจริง คือ 0.834 โดยมีค่า SEP เท่ากับ 0.29% และมีค่า bias เท่ากับ 0.07% นอกจากนี้ค่า RPD มีค่าเท่ากับ 2.4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมีประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในผลเสาวรส ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การประยุกต์ใช้ในโรงคัดบรรจุและอุตสาหกรรมอาหารได้

อนุวัฒน์ รัตนชัย, และจารุวรรณ บางแวก (2559, น. 45-53) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารสารกาบา (Gamma aminobutyric acid; GABA) ในเมล็ดถั่วเหลือง และเมล็ดถั่วเขียวโดยใช้เครื่อง NIR Spectrometer โดยวิธี PLSR พบว่า สมการที่ใช้ประเมินสาร GABA ในเมล็ดถั่วเหลืองมีค่า correlation coefficient (R) เท่ากับ 0.90 ระหว่างค่าปริมาณสาร GABA ในเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้จากการทำนายและค่าปริมาณสาร GABA ในเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.82 ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard Error of prediction, SEP) คือ 2.80 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อน (Standard Deviation, SD) คือ 6.50 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม สมการที่ใช้ประเมินสาร GABA ในเมล็ดถั่วเขียวมีค่าสหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.90 และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.81 มีค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน 2.02 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ซึ่งต่ำกว่าค่าความคลาดเคลื่อนจริง ที่มีค่า 4.83 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม จากการทดลองแสดงว่าเทคนิค NIRS สามารถนำมาใช้ประเมินสาร GABA ได้ และได้นำสมการที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพแบบ Full cross validation ในการประเมินสาร GABA ในเมล็ดถั่วเหลืองมีค่า R^2 เท่ากับ 0.82 สามารถประเมินปริมาณสาร GABA ได้ตั้งแต่ 0.0-30.83 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ขณะที่ประสิทธิภาพของสมการที่ประเมินสาร GABA ในเมล็ดถั่วเขียวมีค่า R^2 เท่ากับ 0.81 และประเมินได้ตั้งแต่ 1.66-23.26 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

อัมรา ทองกลิ่น, และพีระศักดิ์ ฉายประสาท (2561, น. 561-566) ได้ศึกษาวิธีการประเมินคุณภาพทุเรียนหมอนทองแบบไม่ทำลายผลิตผลด้วยเครื่อง NIR spectrometer แบบพกพา พบว่า สมการทดสอบและสมการทำนายค่าร้อยละของน้ำหนักเนื้อแห้ง (DM) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.69 ค่า SEC เท่ากับ 8.29 % ค่า SEP เท่ากับ 10.36% และค่า bias เท่ากับ -4.84% และสมการปริมาณของแข็งที่ละลายน่าได้ (total soluble solid; TSS) มีค่า R^2 เท่ากับ 0.83 ค่า SEC เท่ากับ 7.81 % ค่า SEP เท่ากับ 167 % และค่า bias เท่ากับ -3.52% จากการศึกษาสมการทดสอบและสมการทำนาย พบว่า เทคนิค NIRS ในระบบการวัดแบบสะท้อนกลับที่บริเวณเปลือกทุเรียนมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ในการท่านายค่าร้อยละของน้ำหนักเนื้อแห้ง (DM) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids; TSS) ได้อย่างแม่นยำ ท่าให้สามารถคัดเกรดทุเรียนหมอนทองที่มีคุณภาพดีและมีมาตรฐานเป็นที่ต้องการของตลาดภายในประเทศและต่างประเทศได้มากขึ้น

Chang-ji et al. (2009, pp. 578-582) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินหาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารโพลีแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งด้วยเครื่อง UV-Vis-NIR spectrophotometer โดยเทคนิค PLSR พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการเบื้องต้นด้วยวิธีการ first derivative ในตัวอย่างเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่บดละเอียด โดยให้ค่า Principal component scores (PC score) เท่ากับ 99.947% ค่า RMSECV เท่ากับ 0.7592 และค่า RMSEP เท่ากับ 0.6720 ส่วนแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารโพลีแซ็คคาไรด์ สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการจัดการสปกตรัมเบื้องต้น (no preprocessing) ในตัวอย่างเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่บดละเอียด โดยให้ค่า PC score เท่ากับ 99.959% ค่า RMSECV เท่ากับ 0.0093 และค่า RMSEP เท่ากับ 0.0083

Jia-hui et al. (2009, pp. 622-624) ได้ศึกษาการประเมินหาปริมาณโปรตีนในเส้นใยเห็ดถั่เช่าสีทองอบแห้งด้วยเครื่อง UV-Vis-NIR spectrophotometer โดยวิธี PLSR พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณโปรตีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการสปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีการ first derivative โดยให้ค่า R เท่ากับ 0.9868 ค่า RMSECV เท่ากับ 0.199% และค่า RMSEP เท่ากับ 0.0145%

Hassan (2015, pp. 109-117) ได้ศึกษาการประเมินหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ในข้าวป่าจีนด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer โดยการใช้เทคนิค PLSR พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการสปกตรัมเบื้องต้นด้วยวิธีการ Multiplication scatter correction (MSC) โดยให้ค่า R เท่ากับ 0.985 ค่า RMSEP เท่ากับ 2.41% และค่า RPD เท่ากับ 6.06 ส่วนแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารสารฟลาโวนอยด์สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการจัดการสปกตรัมเบื้องต้น (no preprocessing) โดยให้ค่า R เท่ากับ 0.978 ค่า RMSEP เท่ากับ 1.23% และค่า RPD เท่ากับ 4.81

Xie et al. (2015, pp. 971-977) ได้ศึกษาการประเมินหาปริมาณสารอาร์จินีน (arginine) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าทิเบตด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer พบว่า แบบจำลองซนิด CARS-least squares-support vector machine (CARS-LS-SVM) เป็นแบบจำลองที่ดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารอาร์จินีน โดยให้ค่า R^2_p เท่ากับ 0.8370 ค่า RPD เท่ากับ 2.4741 และค่า RMSEP เท่ากับ 0.0841%

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 การทดลอง ตามจุดประสงค์ของการศึกษา ดังนี้

การทดลองที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 ตอนการทดลอง ดังนี้

ตอนที่ 1 **การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน** 6 **แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 ขวด ดังนี้

1. **ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าที่ใช้ในการศึกษา**

ทำการรวบรวมตัวอย่างเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) จากฟาร์มที่เพาะเลี้ยงเห็ดในประเทศไทย จำนวน 6 แหล่ง (6 สายพันธุ์) เพื่อเป็นการแสดงความบริสุทธิ์ใจว่าการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้มีเจตนาพาดพิงถึงบุคคลหรือสถานที่ใดๆ ที่อาจส่งผลกระทบต่อชื่อเสียงหรือธุรกิจ จึงขอสงวนชื่อแหล่งที่มาของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้งหมด โดยได้เปลี่ยนชื่อเป็นรหัสและจังหวัดแทน ดังตาราง 10

ตาราง 10 **รหัสและแหล่งที่รวบรวมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่าง ๆ**

รหัส	แหล่งที่มา
CM1	กรุงเทพฯ
CM2	กรุงเทพฯ
CM3	ปทุมธานี
CM4	สระบุรี
CM5	เชียงใหม่
CM6	สมุทรปราการ

2. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองลงบนอาหารแข็งพีดีเอ

นำเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่ได้รับมาจากฟาร์มต่างๆ ทั้ง 6 แหล่ง เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม, ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม กลูโคส 20 กรัม (ยี่ห้อ Univar) ยีสต์สกัด 5 กรัม (ยี่ห้อ Himedia) เปปโตน 5 กรัม (ยี่ห้อ Himedia) วิตามินบีหนึ่ง 200 มิลลิกรัม (ยี่ห้อ New Life Pharma) ผงวุ้นบริสุทธิ์ 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ที่ 6.5 โดยมีวิธีการตามขั้นตอนดังนี้

2.1.1 ชั่งกลูโคส 20 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม ผงวุ้นบริสุทธิ์ 15 กรัม และวิตามิน B1 200 มิลลิกรัม (บดละเอียด) ผสมรวมกัน

2.1.2 ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม แล้วหั่นเป็นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และข้าวโพดอ่อน 50 กรัม นำไปต้มจนสุกกับน้ำกลั่น 1 ลิตร กรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่งเทผสมกับส่วนผสมที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1.1 ตั้งไฟอ่อนๆ แล้วเคี่ยวจนส่วนผสมทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับค่า pH ของอาหารที่ 6.6-7

2.1.3 บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ขวดละประมาณ 350 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลีแล้วใช้ถุงพลาสติกมัดหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที

2.1.4 เทใส่จานเพาะเชื้อ (glass petri dish) ที่ปลอดเชื้อประมาณ 15 มิลลิลิตรต่อจานเพาะ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัว

2.1.5 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอลนไฟฆ่าเชื้อ ปล่อยไว้ให้เย็น แล้วเขี่ยเอาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็ง PDA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22-24 °C เป็นเวลา 14 วัน

2.2 การขยายหัวเชื้อในอาหารเหลวพีดีบี

เตรียมอาหารเหลว PDB โดยใช้วัตถุดิบ และหลักการเดียวกันกับการทำ อาหารแข็ง PDA (ยกเว้นผงวุ้นบริสุทธิ์) บรรจุอาหารเหลว PDB ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาณ 350 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยถุงพลาสติกและรัดด้วยหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์เจริญอยู่จากขั้นตอนที่ 2.1 ใส่ลงในอาหารอาหาร PDB จำนวน 2 ชิ้นวุ้นต่อขวด นำไปบ่มบนเครื่อง

เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 22 °C เป็นเวลาประมาณ 7 วัน จะได้เส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารเหลว PDB ของแต่ละสายพันธุ์

2.3 การถ่ายหัวเชื้อจากอาหารเหลว PDB ลงในอาหารข้าว

เตรียมอาหารข้าวเพื่อเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองของแต่ละสายพันธุ์ให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด หรือสโตรมา ประกอบด้วยวัตถุดิบที่เป็นข้าวสารขาวเสาไห้ (ยี่ห้อ เบญจรงค์) 50 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร กรอกข้าวสารและอาหารเหลว PDB ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 28 ออนซ์ ปิดฝาขวดที่เจาะรูแล้วอุดด้วยสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูงที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น ทำการถ่ายเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB ลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 °C ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 60-70% จนเส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะ จากนั้นกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกโดยลดอุณหภูมิในห้องเพาะเลี้ยงลงที่ 18 °C ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 80-90% ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเกิดตุ่มดอกแล้วให้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 22 °C เหมือนเดิม ความชื้นสัมพัทธ์ห้องบ่มประมาณ 80-90% ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เพาะเลี้ยงจนกระทั่งดอกสมบูรณ์โดยใช้เวลา 60 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวเพื่อนำมาประเมินผล

3. **การประเมินผลด้านผลผลิต คุณสมบัติทางกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**

ใช้มือเปิดฝาขวดและนำผลผลิตออกมาทั้งชิ้นจากขวดเพาะแล้ววางบนภาชนะที่สะอาด ใช้คีมคีบดึงก้านเห็ดถั่งเช่าสีทองออกมาเรียงกันในถาดทีละก้านให้ถึงโคนต้นหรืออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ด้วยความระมัดระวัง ประเมินผลด้านผลผลิต คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนี้

3.1 การประเมินผลด้านผลผลิต ได้แก่

3.1.1 จำนวนดอก ต่อขวดเพาะเลี้ยง 1 ขวด เนื่องจากใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตรธัญพืชข้าว 50 กรัมต่อขวด ดังนั้นจึงแสดงหน่วยของผลผลิตเป็น จำนวนดอก ต่อ อาหารเพาะเลี้ยง 50 กรัม

3.1.2 น้ำหนักของดอกสด แสดงหน่วยของผลผลิตเป็น กรัม ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม

3.2 คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่

3.2.1 ลักษณะรูปร่าง ความกว้าง (วัดที่ตำแหน่งกลางดอก) แสดงหน่วยเป็นมิลลิเมตร และความยาวของดอก แสดงหน่วยเป็นเซนติเมตร

3.2.2 วิเคราะห์ความแน่นเนื้อ ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyser) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น QTS25 โดยใช้หัวเข็มปลายทู่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร ค่าที่คำนวณได้เป็นนิวตัน (N)

3.2.3 วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี ด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-1000 และรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*)

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองตามวิธีการของ Huang et al. (2009, pp. 957-961) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ นำตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองของแต่ละสายพันธุ์มาอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นสมุนไพร ชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดมา 1 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 50% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม vortex mixture จากนั้นนำไปแช่ในเครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่าง (ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที และแยกสารละลายส่วนใสโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,900 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสเก็บไว้ ทำการสกัดตัวอย่างสองรอบ เทสารสกัดที่ได้รวมกันและบันทึกปริมาตร กรองสารสกัดที่ได้ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ในขวดเก็บสารเพื่อเตรียมวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน โดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu (Japan) ใช้คอลัมน์ยี่ห้อ Restek รุ่น Ultra IBD (ขนาด 4.6 x 150 มิลลิลิตร ที่มีอนุภาค 5 ไมครอน) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นอุลตราไวโอเล็ต (UV) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร โดยมีสภาวะที่ใช้สำหรับแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำ 90 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเมทานอล 10 มิลลิลิตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์

เท่ากับ 35 °C ใช้สารมาตรฐานคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ของบริษัท Sigma Chemical Corporation เตรียมสารละลายมาตรฐานสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-50 และ 0-120 ไมโครลิตร ตามลำดับ

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การทดลองที่ 1 ตอนที่ 2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ดังนี้

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา

นำเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองของแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญในอาหารเหลว PDB มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัดสำเร็จรูปยี่ห้อ innuPREP Plant DNA Kit (ประเทศเยอรมัน) ดังนี้

1.1 นำเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองปริมาตร 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสาร Lysis Solution OPT ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมสารและตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม vortex mixture ประมาณ 5 วินาที

1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที (ระหว่างการบ่มตัวอย่าง ทำการผสมด้วยเครื่อง vortex mixture ทุกๆ 3-4 นาที)

1.3 เติมสาร Precipitation buffer P ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารและตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture

1.4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดประมาณ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายส่วนใส

1.5 ดูดสารละลายส่วนใสทั้งหมดในใส่ลงใน prefilter (lavender) ที่วางอยู่บน receiver tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

1.6 ดูดสารละลายใน receiver tube ใส่ลงใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลตร อัน ใหม่

1.7 เติมสาร RNase A (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) เป็นเวลา 5 นาที

1.8 เติมสาร Binging Solution SBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน

1.9 ดูดสารละลายทั้งหมดใน microtube ใส่ลงใน spin filter (green) ที่วางอยู่บน receiver tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

1.10 เทสารละลายใน receiver tube ทิ้ง แล้วใส่ spin filter (green) ไว้บน receiver tube เหมือนเดิม

1.11 เติมสาร washing solution MS ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และทำซ้ำกับข้อ 1.10-1.11

1.12 เทสารละลายที่อยู่ใน receiver tube ทิ้ง แล้วใส่ spin filter (green) ไว้บน receiver tube เหมือนเดิม และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

1.13 นำ spin filter (green) วางบน elution tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

1.14 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 25-28 °C เป็นเวลา 2 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

1.15 เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20 °C จนกว่าจะใช้งานต่อไป

2. การตรวจสอบ DNA โดยวิธี Gel electrophoresis

2.1 เตรียมอะกาโรส (agarose) เจล ความเข้มข้น 0.8% โดยชั่งสาร agarose 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสาร 1X TBE ปริมาตร 60 มิลลิลิตร แกว่งวนเบาๆ ให้เข้ากัน

2.2 ต้ม agarose กับสาร 1X TBE โดยนำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุด ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สาร agarose ละลาย

2.3 ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 65 °C แล้วเติมสาร RedSafe DNA Stain (20,000 X) ลงไป 0.5 ไมโครลิตร แกว่งวนเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเทลงในถาดที่ใช้สำหรับการทำ gel electrophoresis รอให้วุ้นแข็งตัว แล้วจึงดึงหวี (comb) ออก

2.4 เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่จะใช้ทำ gel electrophoresis โดยผสมสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสาร DNA loading dye buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการ run gel ที่ค่ากระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 30 นาที

2.5 ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลรุ่น SmartView Pro 1200 Image System ยี่ห้อ Major Science (ประเทศไต้หวัน)

3. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิค RAPD-PCR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ นำมาใช้ทำเป็น template สำหรับการทำ PCR และตรวจสอบผลการทำ PCR โดยวิธี Gel electrophoresis โดยใช้ universal primer จำนวน 25 ไพรเมอร์

(TingChi et al., 2012, pp. 5215-5221) ดังตาราง 11 การทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสาร One PCR™ Plus (GeneDireX®, Taiwan) โดยใช้สภาวะ initiation denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำ 40 รอบ ของ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 20 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 36 °C เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที (TingChi et al., 2012, pp. 5215-5221) จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธี Gel electrophoresis

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

OnePCR™ Plus	12	ไมโครลิตร
Primer	1	ไมโครลิตร
DNA Template	2	ไมโครลิตร
H_2O	10	ไมโครลิตร
รวม	25	**ไมโครลิตร**

4. **การตรวจสอบผลการทำ RAPD-PCR โดยวิธี** Gel electrophoresis

4.1 เตรียมอะกาโรส (agarose) เจล ความเข้มข้น 0.8% โดยชั่งสาร agarose 0.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสาร 1X TBE ปริมาตร 60 มิลลิลิตร แกว่งวนเบาๆ ให้เข้ากัน

4.2 ต้ม agarose กับสาร 1X TBE โดยนำเข้าเครื่องไมโครเวฟที่ความร้อนสูงสุด ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สาร agarose ละลาย

4.3 ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 65 °C แล้วเติมสาร RedSafe DNA Stain (20,000 X) ลงไป 0.5 ไมโครลิตร แกว่งวนเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเทลงในถาดที่ใช้สำหรับการทำ gel electrophoresis รอให้วุ้นแข็งตัว แล้วจึงดึงหวี (comb) ออก

4.4 เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่จะใช้ทำ gel electrophoresis โดยผสมสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสาร DNA loading dye buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำการ run gel ที่ค่ากระแสไฟฟ้า 100 V เป็นเวลา 30 นาที

4.5 ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลรุ่น SmartView Pro 1200 Image System ยี่ห้อ Major Science (ประเทศไต้หวัน)

5. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

นำภาพเจลที่ได้จากการทำ electrophoresis ของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ มาวิเคราะห์รูปแบบของแถบ DNA (Band reading) โดยพิจารณาจาก

5.1 เปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (DNA pattern) จากภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบแต่ละสายพันธุ์ว่ามีขนาดดีเอ็นเอและจำนวนเท่าไร (เทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย)

5.2 สายพันธุ์ใดที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ที่ขนาดเท่ากัน) ให้อ่านผลเป็นตัวเลข 1 และถ้าเชื้อใดไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ที่ขนาดเท่ากัน) ให้อ่านผลเป็นตัวเลข 0 ข้อมูลการให้คะแนนนี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรมทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Sokal and Sneath 3 นำค่าความเหมือนที่ได้มาแสดงในรูปแผนภูมิความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Unweighted pair Group Method (UPGMA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป FreeTree ร่วมกับโปรแกรม TreeView

ตาราง 11 ข้อมูล universal primer ที่ใช้ในการทดลอง

Primer code	Nucleotide sequence (5'→ 3')	Primer code	Nucleotide sequence (5'→ 3')
OPA-03	AGTCAGCCAC	OPE-11	GAGTCTCAGG
OPA-06	GGTCCCTGAC	OPE-13	CCCGATTCGG
OPA-10	GTGATCGCAG	OPF-16	GGAGTACTGG
OPA-17	GACCGCTTGT	OPF-20	GGTCTAGAGG
OPB-06	TGCTCTGCCC	OPG-10	AGGGCCGTCT
OPB-20	GGACCCTTAC	OPG-12	CAGCTCACGA
OPC-01	TTCGAGCCAG	OPH-03	AGACGTCCAC
OPC-07	GTCCCGACGA	OPJ-14	CACCCGGATG
OPC-19	GTTGCCAGCC	OPJ-20	AAGCGGCCTC
OPC-20	ACTTCGCCAC	OPT-16	GGTGAACGCT
OPD-03	CATCCCCCTG	OPT-19	GTCCGTATGG
OPD-06	ACCTGAACGG	OPX-01	CTGGGCACGA
OPD-11	AGCGCCATTG		

ที่มา: TingChi et al., 2012, pp. 5215-5221

การทดลองที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 ตอนการทดลอง ดังนี้

ตอนที่ 1 เพื่อศึกษาส่วนประกอบที่เหมาะสมของสูตรอาหารข้าวในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 ขวด ดังนี้

1. การเตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร ประเทศไทย เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการทำเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อทิ้งให้เย็น จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเอาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็ง PDA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการขยายหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB โดยเตรียมอาหารเหลว PDB ซึ่งใช้วัตถุดิบ (ยกเว้นผงวุ้นบริสุทธิ์) และวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการทำอาหารแข็ง PDA กรอกอาหารเหลว PDB ลงในขวดโซดาประมาณ 350 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยถุงพลาสติกแล้วมัดด้วยหนังยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นใช้คอร์ก บอยเลอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ใส่ลงในอาหารอาหาร PDB จำนวน 2 ชิ้นวุ้นต่อขวด นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นเวลาประมาณ 7 วัน จะได้เส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารเหลว PDB

2. การเตรียมสูตรอาหารข้าวและการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 เตรียมวัตถุดิบสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่

- ข้าวขาวเสาไห้ 100% (ยี่ห้อ เบญจรงค์)
- ไข่ไก่ (ไข่ดิบที่ได้จากการตีไข่แดงและไข่ขาวให้เข้ากัน)
- ดักแด้ไหม
- น้ำนมโค รสจืด (ยี่ห้อ ไทยเดนมาร์ก)
- อาหารเหลว PDB ที่ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม กลูโคส 20 กรัม (ยี่ห้อ Univar) ยีสต์สกัด 5 กรัม (ยี่ห้อ Himedia) เปปโตน 5 กรัม (ยี่ห้อ Himedia) วิตามินบีหนึ่ง 200 มิลลิกรัม (ยี่ห้อ New Life Pharma) และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ที่ 6.5 ซึ่งรายละเอียดขั้นตอนการทำได้อธิบายไว้แล้วในการทดลองที่ 1

2.2 กำหนดสูตรอาหารที่ประกอบด้วยวัตถุดิบชนิดต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน จำนวน 16 สูตร และสูตรอาหารที่กำหนดให้เป็นตัวควบคุม (control) จำนวน 1 สูตร ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ดังตาราง 12

2.3 ใส่วัตถุดิบที่กำหนดไว้ในแต่ละสูตรตามตาราง 12 ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 28 ออนซ์ ปิดฝาขวดที่เจาะรูและอุดด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2.4 ทำการหยอดเชื้อเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงไปในขวดที่มีอาหารข้าวด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ปิดฝาขวดแล้วนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 22 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70% ทำการบันทึกการเจริญของเส้นใย

2.5 กระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกเห็ดโดยลดอุณหภูมิลงที่ 18 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70% ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง จนกระทั่งมีตุ่มดอกเกิดขึ้นแล้วทำการบันทึกผล

2.6 ปรับอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงที่ 22 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80-90% ให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง และบันทึกผลการเจริญของดอกเห็ด

3. การเก็บเกี่ยวผลผลิตและการประเมินผล

ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 63 วัน โดยใช้แอลกอฮอล์ 70% ฉีดพ่นบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยวรวมถึงอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง จากนั้นเปิดฝาขวดและนำผลผลิตออกมาทั้งชิ้นจากขวดเพาะเลี้ยงแล้ววางบนภาชนะที่สะอาด ใช้ที่คีบดึงก้านเห็ดถั่งเช่าสีทองออกมาเรียงกันในถาดทีละก้านให้ถึงโคนต้นหรืออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์เพื่อนำมาประเมินผลด้านต่างๆ ต่อไป

3.1 การประเมินผลด้านการเจริญเติบโตของเส้นใย ได้แก่ ระยะเวลาในการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเพาะ และระยะเวลาการเกิดตุ่มดอก

3.2 การประเมินผลด้านผลผลิต และคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดอกเห็ด ได้แก่

3.2.1 จำนวนดอกต่อขวดเพาะเลี้ยง 1 ขวด เนื่องจากใช้อาหารเพาะธัญพืชข้าว 50 กรัม ดังนั้นจึงแสดงหน่วยของผลผลิตเป็นจำนวนดอก ต่อ 50 กรัมของอาหารข้าว

3.2.2 น้ำหนักของดอกสด แสดงหน่วยของผลผลิตเป็นปริมาณน้ำหนักต่อ 50 กรัมของอาหารข้าว

3.2.3 ขนาดความยาวของดอก แสดงหน่วยเป็นเซนติเมตร โดยแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ 1-3 เซนติเมตร, 4-6 เซนติเมตร, 7-9 เซนติเมตร และมากกว่า 9 เซนติเมตร

3.2.4 ความสมบูรณ์ของก้านดอกโดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก แสดงหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยแบ่งเป็น 4 ช่วงคือ 1-3 มิลลิเมตร, 4-6 มิลลิเมตร, 7-9 มิลลิเมตร และมากกว่า 9 มิลลิเมตร

ตาราง 12 ส่วนประกอบ (components) ของวัตถุดิบในแต่ละสูตรอาหาร (formula)

Formula	Components				
	Rice (g)	Fresh egg (mL)	Silkworm (g)	Milk (mL)	PDB (mL)
Control	50	-	-	-	50
M1	50	10	-	-	40
M2	50	20	-	-	30
M3	50	30	-	-	20
M4	50	-	-	10	40
M5	50	-	-	20	30
M6	50	-	-	30	20
M7	50	5	-	5	40
M8	50	10	-	10	30
M9	50	15	-	15	20
M10	50	10	30	-	40
M11	50	20	30	-	30
M12	50	30	30	-	20
M13	50	-	30	10	40
M14	50	-	30	20	30
M15	50	-	30	30	20
M16	50	-	30	-	50

3.2.5 วิเคราะห์ความแน่นเนื้อ ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyser) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น QTS25 โดยใช้หัวเข็มปลายทู่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร ค่าที่คำนวณได้เป็นนิวตัน (N)

3.2.6 วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี ด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-1000 และรายงานผลเป็นค่า L*, a* และ b*

3.2.7 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS) ด้วยเครื่อง Digital Hand-Held Refractometer Pocket ยี่ห้อ ATAGO รุ่น Pal-1 อ่านค่าเป็น %Brix

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองตามวิธีการของ Huang et al. (2009, pp. 957-961) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ นำดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้มาอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นสมุนไพร ชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดมา 1 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 50% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixture) จากนั้นนำไปแช่ในเครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่าง (ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที และแยกสารละลายส่วนใสโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,900 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้ ทำการสกัดตัวอย่างสองรอบ เทสารสกัดที่ได้รวมกันและบันทึกปริมาตร กรองสารสกัดที่ได้ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ในขวดเก็บสารเพื่อเตรียมวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนต่อไป

3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน โดยนำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากข้อ 4.3.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu (ประเทศญี่ปุ่น) ใช้คอลัมน์ยี่ห้อ Restek รุ่น Ultra IBD (ขนาด 4.6 x 150 มิลลิลิตร ที่มีอนุภาค 5 ไมครอน) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นอุลตราไวโอเล็ต (UV) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร โดยมีสภาวะที่ใช้สำหรับแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำ 90 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเมทานอล 10 มิลลิลิตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์เท่ากับ 35 °C ใช้สารมาตรฐานคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ของบริษัท Sigma Chemical

Corporation เตรียมสารละลายมาตรฐานสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-50 และ 0-120 ไมโครลิตร ตามลำดับ

3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดถั่งเช่า

เมื่อทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า ความชื้น คาร์โบไฮเดรต พลังงาน ใยอาหาร และน้ำตาลรวม ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2005)

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การทดลองที่ 2 ตอนที่ 2 เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ดีที่สุด

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 ขวด ดังนี้

1. **การเตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง**

เตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร ประเทศไทย ลงในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB ตามลำดับ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

2. **การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารข้าว**

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากผลการทดลองในตอนที่ 1 โดยถ่ายเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เตรียมได้ลงในอาหารข้าวโดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 9 สัปดาห์

3. การเก็บตัวอย่างและประเมินผล

ทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างที่ตัวอย่างกำลังเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ เพื่อนำมาประเมินผลในด้านต่างๆ ได้แก่

3.1 การประเมินผลด้านผลผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด ได้แก่ ขนาดความยาวของดอก ความแน่นเนื้อ สีดอก และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) โดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

3.2 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้โดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 500 ขวด โดยเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่ได้รับมาจากบริษัท ถั่งเช้าทองคำ จำกัด จังหวัดปทุมธานี ลงในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB ตามลำดับ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารข้าว ที่ประกอบด้วยข้าวขาวเสาไห้ 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกโดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองและนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Memmert รุ่น UF55 (ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

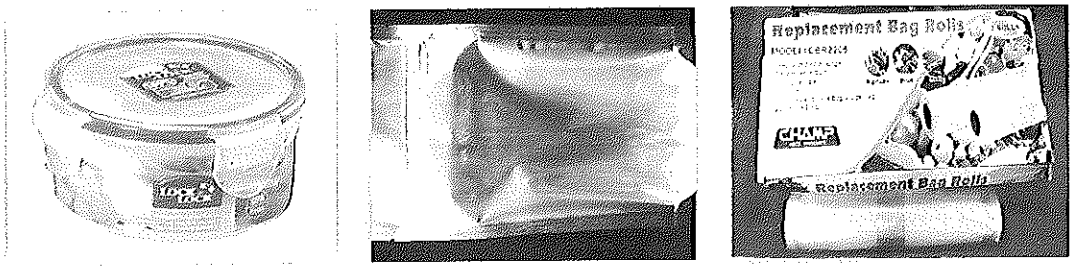
2. ชนิดของบรรจุภัณฑ์และการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ

2.1.1 กล่องพลาสติกถนอมอาหาร ยี่ห้อ LOCK&LOCK ทรงกลม (model HPL932) ขนาดบรรจุ 300 มิลลิลิตร (ภาพ 14 ก)

2.1.2 ถุงอะลูมิเนียมฟอยด์แบบซิปล็อค (size: 165.1 × 254 mm) ตั้งได้ ความหนาขนาด 100 ไมครอน (ภาพ 14 ข)

2.1.3 ฟิล์มพลาสติกชนิด polyamide ผสมกับ low density polyethylene (PA/LDPE) ยี่ห้อ Champ (model #CBR2206) ขนาดหน้ากว้าง 22 เซนติเมตร (ภาพ 14 ค)



(ก) (ข) (ค)

ภาพ 14 บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

หมายเหตุ: (ก) กล่องพลาสติกเก็บอาหาร (ข) ถุงอลูมิเนียมฟอยด์แบบซิปล็อค (ค) ฟิล์มพลาสติกชนิด polyamide ผสมกับ low density polyethylene (PA/LDPE)

2.2 การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทอง

นำตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 2.5 กรัม บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์แต่ละชนิด สำหรับการเก็บรักษาในฟิล์มพลาสติก PA/LDPE นั้น หลังจากบรรจุตัวอย่างแล้วทำให้อยู่ในสภาวะสุญญากาศด้วยเครื่อง Vacuum sealer ยี่ห้อ Quickpack group (ประเทศอิตาลี) หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ ที่อุณหภูมิต่ำ 5 °C ในตู้เย็นแช่เครื่องดื่ม และที่อุณหภูมิห้อง 30 ± 5 °C ในห้องปกติ จะได้ 6 สภาวะการทดลอง เปรียบเทียบกับตัวอย่างเห็ดที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ซึ่งกำหนดให้เป็นตัวควบคุม (control) จำนวน 2 สภาวะการทดลอง รวมเป็น 8 สภาวะการทดลอง ดังตาราง 13 ใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษานาน 12 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างมาประเมินผลในด้านต่างๆ ทุกเดือน และสุ่มวัดความชื้นสัมพัทธ์ในตู้เย็นและห้องที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างอาทิตย์ละครั้งตลอดการเก็บรักษา

ตาราง 13 วิธีการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาวะที่แตกต่างกัน

สภาวะการทดลอง	วิธีการเก็บรักษา
Control 1	วางในจานแก้วที่อุณหภูมิ 5°C โดยไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์
Control 2	วางในจานแก้วที่อุณหภูมิ 30 ± 5°C โดยไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์
1	เก็บในกล่องพลาสติกถนอมอาหารที่อุณหภูมิ 5°C
2	เก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยด์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 5°C
3	เก็บในฟิล์มพลาสติก PA/LDPE ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 5°C
4	เก็บในกล่องพลาสติกถนอมอาหารที่อุณหภูมิ 30 ± 5°C
5	เก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยด์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 30 ± 5°C
6	เก็บในฟิล์มพลาสติก PA/LDPE ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 ± 5°C

3. **การประเมินผลการทดลอง**

3.1 ประเมินผลก่อนการเก็บรักษา โดยสุ่มตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองหลังจากผ่านการอบแห้งแล้วมาวิเคราะห์ผลด้านต่างๆ ได้แก่

3.1.1 ประเมินผลด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่

1) วัดค่าดูดกลับความชื้นของตัวอย่าง โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) จากการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของตัวอย่างหลังการเก็บรักษาโดยคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{ การดูดกลับความชื้น} = \frac{\text{นน. ของตัวอย่างหลังการเก็บรักษา} - \text{นน. ของตัวอย่างก่อนการเก็บรักษา} \times 100}{\text{นน. ของตัวอย่างก่อนการเก็บรักษา}}$$

2) วัดค่า Water activity (a_w) โดยด้วยเครื่อง water activity analyzer ยี่ห้อ NOVASINA (ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

3) วิเคราะห์ความแน่นเนื้อ ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyser) ยี่ห้อ Brookfield รุ่น QTS25 โดยใช้หัวเข็มปลายทู่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 เซนติเมตร ค่าที่คำนวณได้เป็นนิวตัน (N)

4) วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี ด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Minolta รุ่น DP-1000 และรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*), ค่าสีแดง (a*), ค่าสีเหลือง (b*) และค่า Hue angle (H^o)

5) วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS) ด้วยเครื่อง Digital Hand-Held Refractometer Pocket ยี่ห้อ ATAGO รุ่น Pal-1 อ่านค่าเป็น %Brix

3.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปินโดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

3.1.3 วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการต่อต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์คะตาเลส (catalase; CAT) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POX) ตามขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดเอนไซม์

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่บดเป็นผง 0.2 กรัม ผสมกับสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (pH 6.4) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และสาร PVP (Poly Vinyl Pyrrolidone) 0.2 กรัม เพื่อกำจัดสารประกอบพวกฟีนอลิก นำไปแช่ในเครื่องอุลตราโซนิคชนิดอ่างเพื่อสกัดเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที จะได้สารละลายใส (crude extract) สำหรับวิเคราะห์โปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ SOD, CAT และ POX ต่อไป (Wang et al., 2005, pp. 74-79)

2) การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Bradford

ทำการปิเปต crude extract ที่เตรียมไว้แล้ว 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และสารละลาย Bradford reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) (Bradford, 1976, pp. 248-254) (ภาคผนวก ค)

3) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ SOD

วิเคราะห์โดยใช้ระบบ XO/XTT (XO = xanthine oxidase, XTT = 2, 3- bis [2- methoxy- 4- nitro- 5- sulfophenyl] - 2H- tetrazolium- 5- carboxyanilide inner salt) (Ukeda et al, 1997, pp. 206-209) โดยเตรียมสารผสมปริมาณ 3 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8) ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร เติม xanthine 3 mM ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร, 3 mM Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร, 3 mM XTT ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร, crude extract 0.1 มิลลิลิตร (blank ใช้น้ำกลั่น) และ XO (56.1 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) 0.1 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาจะเริ่มต้นเมื่อเติม xanthine oxidase จากนั้นนำมาวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu (ประเทศญี่ปุ่น) อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ SOD จากสูตรสมการดังนี้ (1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับ 50% ของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm ของหลอดควบคุม)

$$\text{อัตราส่วนการยับยั้งโดยกิจกรรมของเอนไซม์ SOD} = \frac{A_{470}(\text{blank}) - A_{470}(\text{sample})}{A_{470}(\text{sample})}$$

เมื่อ $A_{470}(\text{blank})$ = ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น

$A_{470}(\text{sample})$ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำอัตราส่วนการยับยั้งโดยกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มาคำนวณเทียบกับปริมาณโปรตีนในตัวอย่างนั้นๆ และรายงานผลในหน่วย ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามสมการดังนี้

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ SOD} = \frac{\text{อัตราส่วนการยับยั้งโดยกิจกรรมของเอนไซม์ SOD}}{\text{ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างนั้นๆ (มิลลิกรัม)}}$$

4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (CAT)

ทำการเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) รวมทั้งหมด 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบซึ่งประกอบด้วย 5.9 mM H_2O_2 ใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) ปริมาณ 2.9 มิลลิลิตร และ crude extract 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) ทำการบันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ CAT โดยวิเคราะห์จากการสลายตัวของ H_2O_2 ซึ่ง 1 ยูนิตของ CAT คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 1 μmole ต่อ 1 นาที ต่อ มิลลิกรัมของโปรตีน (molar absorbance coefficient ของ H_2O_2 เท่ากับ 00.0436 $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$) (Fghire et al, 2013, pp. 62-68)

5) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase (POX)

ทำการผสมสารละลาย 100 μM potassium phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร, H_2O_2 ความเข้มข้น 3% ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และสาร guaiacol ความเข้มข้น 4% ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 3 นาที จากนั้นเติม crude extract

50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทำการบันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที เป็นเวลา 2 นาที โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีหน่วยเป็นยูนิต ต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที โดย 1 ยูนิต หมายถึง ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้น 0.1 หน่วยต่อนาที ตามสูตรคำนวณดังนี้ (Furumo, & Furutani, 2008, pp. 1-7)

$$\text{POD activity} = A_{470} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

3.2 ทำการประเมินผลตัวอย่างในระหว่างการเก็บรักษาทุกเดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยนำมาวิเคราะห์ผลด้านต่างๆ ได้แก่

3.2.1 เปอร์เซ็น (%) การดูดกลับความชื้น โดยคำนวณจาก

$$\% \text{ การดูดกลับความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักของตัวอย่างหลังเก็บ} - \text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเก็บ}) \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเก็บ}}$$

3.2.2 วิเคราะห์ความแน่นเนื้อ, ค่า water activity (a_w), ค่าสี, ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้, สารอะดีโนซีน, สารคอร์ไดเซปิน, เอนไซม์ซม์ SOD, เอนไซม์ CAT และเอนไซม์ POX โดยใช้วิธีการเดียวกันกับการประเมินตัวอย่างก่อนการเก็บรักษา

4. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การทดลองที่ 4 การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมอาหารแข็ง PDA โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองเจริญอยู่ (เชื้อเห็ดได้รับมาจากบริษัทถั่งเช้าทองคำ จำกัด) วางในอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้ บ่มเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นระยะเวลา 14 วัน จะได้เส้นใยที่เจริญเป็นโคโลนีบนอาหาร PDA ทำการบันทึก

ผลการเจริญเติบโตของเส้นใย เส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้นี้จะใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture) ที่จะนำไปเก็บรักษาในวิธีการที่แตกต่างกันต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนการเก็บรักษาและการประเมินผล

ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) โดยใช้คอร์กบอยเลอร์เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ของกล้าเชื้อเริ่มต้นจำนวน 2 ชิ้นวุ้น ลงในอาหารเหลว PDB โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จะได้เชื้อเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB จากนั้นถ่ายเชื้อเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารข้าว ที่ประกอบด้วยข้าวขาวเสาไห้ 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกโดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 เป็นระยะเวลา 60 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดเพื่อนำมาประเมินผลในด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ จำนวนดอก น้ำหนักสด ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) สีดอก ปริมาณสารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน โดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

3. วิธีการเก็บรักษา

ทำการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยที่เป็นเส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้นในวิธีการที่แตกต่างกัน 8 วิธี ดังนี้

3.1 วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% มีวิธีการดังนี้

เตรียมกลีเซอรอล 10% ในน้ำกลั่น ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดใส่ในหลอดเก็บเชื้อ (cryotube) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตรเจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ของกล้าเชื้อวางลงในหลอด cryotube ที่บรรจุกลีเซอรอล 10% จำนวน 1 ชิ้นวุ้น แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

3.2 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%

เทคนิคนี้มีวิธีการและขั้นตอนเหมือนกันกับวิธีที่ 1 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา คือ เปลี่ยนจากเก็บที่อุณหภูมิ -80°C ในตู้แช่แข็ง เป็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C ในตู้เย็นแทน

3.3 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C มีวิธีการดังนี้

นำข้าวขาว (เสาไห้) แช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน เสร็จแล้วทำให้สะเด็ดน้ำ บรรจุลงในขวดแก้ว ขนาด 4 ออนซ์ ในปริมาณ 10 กรัมต่อขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นอาหารที่มีเส้นใยของกล้าเชื้อเจริญอยู่วางลงในขวดที่บรรจุเมล็ดข้าวอบแห้ง จำนวน 1 ชิ้นวุ้น จากนั้นนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C

3.4 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C เทคนิคนี้มีวิธีการและขั้นตอนเหมือนกันกับวิธีที่ 3 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งข้าว โดยให้เปลี่ยนเป็นอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C แทน

3.5 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C โดยวิธีการและขั้นตอนเหมือนกันกับวิธีที่ 3 และ 4 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งข้าว โดยให้เปลี่ยนเป็นอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C แทน

3.6 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 มีวิธีการดังนี้

เตรียมอาหารแข็ง PDA ลงในจานเพาะเชื้อ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ของกล้าเชื้อวางลงในอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22°C เป็นระยะเวลา 14 วัน จะได้เชื้อรุ่นที่ 1 (subculture 1) จากนั้นนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C

3.7 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2 มีวิธีการดังนี้

เตรียมอาหารแข็ง PDA ลงในจานเพาะเชื้อ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ของ subculture 1 วางลงในอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22°C เป็นระยะเวลา 14 วัน จะได้เชื้อรุ่นที่ 2 (subculture 2) จากนั้นนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C

3.8 วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีวิธีการดังนี้

เตรียมอาหารแข็ง PDA ลงในจานเพาะเชื้อ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1 ใช้คอร์กบอยเลอร์ขนาด 2.5 เซนติเมตร เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่ของ subculture 2 วางลงในอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22°C เป็นระยะเวลา 14 วัน จะได้เชื้อรุ่นที่ 3 (subculture 3) จากนั้นนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C

4. การประเมินผล

ทำการเก็บรักษาเชื้อเห็ดเป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยเก็บตัวอย่างมาประเมินผลด้านต่างๆ ในทุก 4 เดือน เป็นเวลา 12 เดือน ดังนี้

4.1 การรอดชีวิตของเชื้อ (viability) และความบริสุทธิ์ของเชื้อ (purity)

นำตัวอย่างที่จะทำการประเมินมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง PDA บรรจุอยู่ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น (control) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22°C เป็นระยะเวลา 14 วัน บันทึกจำนวนจานเพาะที่มีเส้นใยเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง PDA และทำการวัดขนาดโคโลนีของเส้นใยที่มีการเจริญเติบโต ส่วนการประเมินผลความบริสุทธิ์ของเชื้อให้คำนวณเป็นเปอร์เซ็น (%) จากจำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อน ดังนี้

$$\% \text{ ความบริสุทธิ์ของเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่ปนเปื้อน} \times 100}{\text{จำนวนจานเพาะเชื้อทั้งหมดในแต่ละวิธีทดลอง}}$$

4.2 การคงสภาพของเชื้อ (stability)

นำตัวอย่างที่จะทำการประเมินมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง PDA บรรจุอยู่ โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเริ่มต้น (control) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 22°C เป็นระยะเวลา 14 วัน ใช้คอร์กบอยเลอร์เจาะวุ้น PDA ที่มีเส้นใยเจริญอยู่จำนวน 2 ชิ้นวุ้น ลงในอาหารเหลว PDB โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับ control จะได้เชื้อเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB จากนั้นถ่ายเชื้อเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารข้าว โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับ control หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน ทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดเพื่อนำมาประเมินผลในด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ จำนวนดอก น้ำหนักสด ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) สีดอก ปริมาณสารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน โดยใช้หลักการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1

5. วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การทดลองที่ 5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS)

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ดังนี้

1. **การเตรียมตัวอย่างและตรวจวัดสเปกตรัม**

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด โดยใช้เชื้อเห็ดจากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PDB โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1 จากนั้นถ่ายเชื้อเห็ดที่เป็นเส้นใยในอาหาร PDB ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารข้าวที่มีสูตรที่แตกต่างกันเพื่อทำให้ได้ปริมาณของสารอะดีโนซีนแคอร์ไดเซปินที่มีความแตกต่างกันในหลายระดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน โดยใช้หลักการการเดียวกันตามที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 จะได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 39 ตัวอย่าง หลังจากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างในวิธีที่แตกต่างกัน 4 วิธี ก่อนที่จะนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer (NIRS) ยี่ห้อ Bruker รุ่น Matrix-F duplex (ประเทศเยอรมัน) ดังภาพ 15 ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) 12500-3500 cm^{-1} (ความยาวคลื่นเท่ากับ 700-2500 นาโนเมตร) ดังนี้

วิธีที่ 1 การวิเคราะห์ในดอกสดโดยไม่ทำลายดอกเห็ด

นำส่วนที่เป็นดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง 10 กรัม ของแต่ละตัวอย่างใส่ลงในกระป๋องอะลูมิเนียมทรงกลม (aluminium moisture can) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร จากนั้นแล้วนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIR spectrometer (ภาพ 16 ก)

วิธีที่ 2 การวิเคราะห์ในดอกสดที่ผ่านการสับเป็นชิ้นเล็กๆ

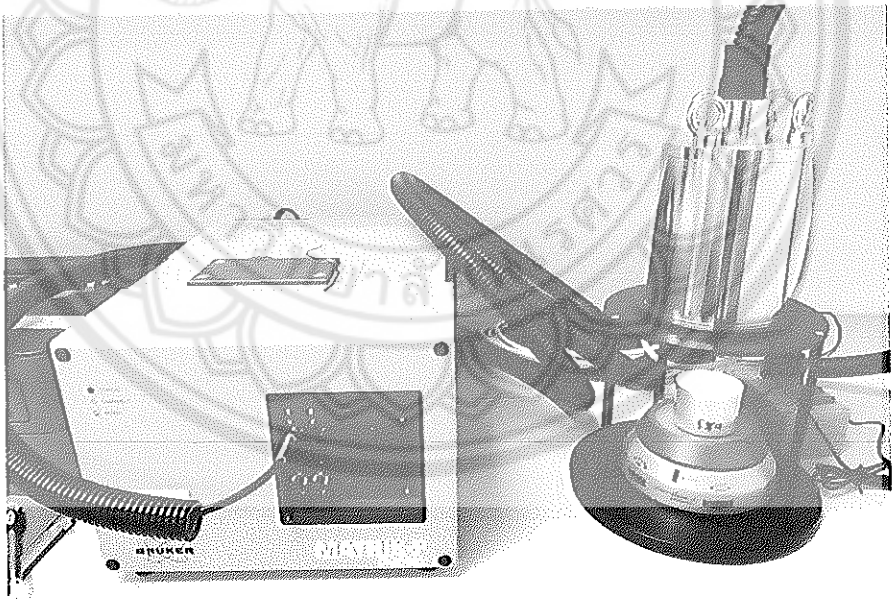
นำดอกเห็ดแต่ละตัวอย่างจากวิธีที่ 1 ที่ผ่านการวัดสเปกตรัมแล้ว มาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดเท่าๆ กัน (ภาพ 16 ข) จากนั้นนำไปวัดสเปกตรัมอีกครั้งด้วยเครื่อง NIRS

วิธีที่ 3 การวิเคราะห์ในดอกอบแห้งที่บดละเอียด

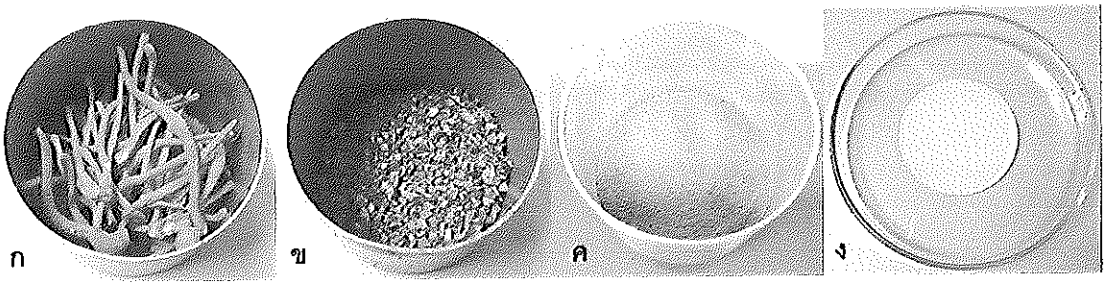
นำดอกเห็ดแต่ละตัวอย่างจากวิธีที่ 2 ที่ผ่านการวัดสเปกตรัมแล้ว มาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพรจะได้ดอกอบแห้งบดละเอียด (ภาพ 16 ค) แล้วนำไปวัดสเปกตรัมอีกครั้งด้วยเครื่อง NIR spectrometer

วิธีที่ 4 การวิเคราะห์สารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว

นำดอกเห็ดแต่ละตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจากวิธีที่ 3 ที่วัดสเปกตรัมแล้วมาสกัดสาร (crude extract) โดยนำเห็ดบดละเอียดตัวอย่างละ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 50% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันโดยเครื่องผสม (vortex mixer) หลังจากนั้นนำไปแช่ในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 9,900 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนที่ใสซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ ดูดสารสกัดหยาบปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในกระดาษกรองใยแก้ว ขนาด 47 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Johnson รุ่น GF/C (ประเทศอังกฤษ) ที่วางบนจานเพาะเชื้อแก้ว (glass petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายเมทานอลและน้ำระเหย จะได้สารสกัดแห้งในกระดาษกรองใยแก้ว (ภาพ 16 ง) แล้วนำกระดาษกรองใยแก้วไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIR spectrometer ส่วนสารสกัดหยาบที่เหลือเก็บใส่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 °C เพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินด้วยเครื่อง HPLC



ภาพ 15 เครื่อง NIR spectrometer แบบตั้งโต๊ะ รุ่น Matrix-F duplex (Bruker, Germany)



ภาพ 16 รูปแบบการเตรียมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง

หมายเหตุ: (ก) ดอกสด (ข) ดอกสดสับ (ค) ผงดอกอบแห้ง (ง) สารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว

2. **ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินด้วยเครื่อง** HPLC

นำสารสกัดหยาบของแต่ละตัวอย่างที่สกัดได้จากวิธีที่ 4 มาวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินโดยใช้หลักการเดียวกันตามที่อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 จากนั้นทำการคำนวณค่า SEL (Standard Error of Laboratory) ซึ่งแสดงความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์จากสมการ

$$SEL = \left[\frac{\sum_i \left(\sum_j \left(x_{ij} - x_i\right)^2 / (R-1)\right)}{N}\right]^{0.5}$$

เมื่อ X_{ij} คือ ค่าที่วัดได้ในแต่ละซ้ำ

X_i คือ ค่าเฉลี่ยจากจำนวนซ้ำทั้งหมดที่วัดได้จาก

R คือ จำนวนซ้ำ

N คือ จำนวนตัวอย่าง

3. **การสร้างสมการและทดสอบประสิทธิภาพของสมการ**

การสร้างสมการทำนายทำโดยสร้างความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่วัดโดยวิธีมาตรฐาน HPLC กับข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเลขคลื่น 12500 ถึง 3500 cm^{-1} โดยวิธี Partial least squares regression (PLSR) ด้วยโปรแกรม OPUS version 7.2 (ประเทศเยอรมัน) โดยใช้สเปกตรัมที่ไม่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น

(no preprocessing) หรือที่มีการจัดการสเปกตรัมเบื้องต้น 2 วิธี คือ วิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) โดยแบ่งข้อมูลออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ (calibration set) กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของสมการ (validation set) ในสัดส่วน calibration set ต่อ validation set เท่ากับ 1 : 1 แล้วทำการพิสูจน์แบบจำลองโดยวิธี Test set เมื่อได้แบบจำลองจะคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าต่างๆ ได้แก่

3.1 ค่า Coefficient of determination (R^2) ที่มากที่สุด

3.2 ค่า Root mean square error of prediction (RMSEP) และค่า Standard Error of Prediction (SEP) ที่ต่ำที่สุด โดยค่า RMSEP และค่า SEP คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(e_i)^2}{n}}$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum(e_i - \bar{e})^2}{n-1}}$$

เมื่อ e_i = $y_i - \hat{y}_i$

$\bar{e}$ = ค่าเฉลี่ยของ e_i

$\hat{y}$ คือ ค่าที่ได้วัดโดยวิธีมาตรฐาน

y คือ ค่าที่ทำนายได้

n คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม validation set

3.3 ค่า Residual predictive deviation (RPD) ที่มากที่สุด

3.4 ค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (bias) ที่ต่ำที่สุด โดยคำนวณได้จากสมการ

$$\bar{e} = \frac{1}{n}\sum e_i$$

4. การทดสอบสมการกับกลุ่มตัวอย่าง

ทำการทดสอบความแม่นยำของสมการกับกลุ่มตัวอย่างใหม่ โดยนำสมการที่ดีที่สุดของแต่ละตัวอย่างจากการประเมินรอบแรกมาทดสอบกับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองกลุ่มใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเตรียมเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกัน 4 แบบ รวมทั้งนำไปวัดสเปกตรัมโดยใช้วิธีการเดียวกันกับการสร้างสมการ และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC หลังจากนั้นทำการทดสอบความถูกต้องของสมการด้วยโปรแกรม OPUS version 7.2 (ประเทศเยอรมัน) นำค่าที่ทำนายได้มาเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC จากนั้นทดสอบค่าทางสถิติของค่า bias, SEP และ slope ตามมาตรฐาน ISO12099 ตามวิธีการดังนี้

4.1 การวิเคราะห์ค่า bias (paired t-test) คำนวณจากสมการ

$$T_b = \pm \frac{t_{(1-\alpha/2)} \times SEP}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ T_b คือ ขีดจำกัดของค่า bias

n คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม validation set

โดย ถ้าค่า bias < T_b แสดงว่า ไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.2 การวิเคราะห์ค่า SEP (F-test, ratio of 2 variances) คำนวณจากสมการ

$$T_{UE} = SEC\sqrt{F_{(\alpha:v,M)}}$$

โดย

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n_c - p - 1}}$$

เมื่อ n_c คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม calibration set

p คือ จำนวนแฟคเตอร์

T_{ue} คือ ขีดจำกัดของค่า SEP

α คือ ความน่าจะเป็นที่ทำให้เกิดข้อผิดพลาดที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ν คือ n-1 (n = จำนวนตัวอย่าง)

M คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่ม calibration set

โดย ถ้าค่า SEP < ค่า T_{ue} แสดงว่า ค่า SEP ถูกยอมรับที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4.3 การวิเคราะห์ค่า slope

4.3.1 การหาค่า slope จากสมการ

$$b = \frac{S_{\hat{y}y}}{S^2_{\hat{y}}}$$

เมื่อ $S_{\hat{y}y}$ คือ ค่า covariance ระหว่างค่าจริงกับค่าที่ทำนายได้

$S^2_{\hat{y}}$ คือ ค่า variance ของ n กลุ่ม prediction set

4.3.2 การหาค่า Intercept จากสมการ

$$a = \bar{y} - b\bar{\hat{y}}$$

เมื่อ $\bar{\hat{y}}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าที่ทำนายได้

$\bar{y}$ คือ ค่าเฉลี่ยของค่าจริง

4.3.3 การทดสอบ slope จากสมการ

$$t_{obs} = |b - 1| \sqrt{\frac{S^2_{\hat{y}}(n-1)}{S^2_{res}}}$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่างของกลุ่ม validation set

$S^2_{\hat{y}}$ คือ ค่า variance ของ n กลุ่ม prediction set

S_{res} คือ resident standard deviation คำนวณได้จากสมการ

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum[y_i - (a + b\hat{y}_i)]^2}{n - 2}}$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่างของกลุ่ม prediction set

a คือ ค่า Intercept

b คือ ค่า slope

y_i คือ ค่าจริง

$\hat{y}_i$ คือ ค่าที่ทำนายได้

ถ้า $t_{obs} \geq t_{(1-\alpha/2)}$ แสดงว่า ค่า slope มีความแตกต่างจากค่า 1

โดย $t_{(1-\alpha/2)}$ คือ *t*-value for a probability of α = 0.05 (5%)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การพิสูจน์เอกลักษณ์ การเพาะเลี้ยง การเก็บรักษาหัวเชื้อ การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์ และการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) ผลการวิจัยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ผลการทดลองที่ 1 ตอนที่ 1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจากฟาร์มเพาะเลี้ยงเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย จำนวน 6 แหล่ง ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทอง จำนวน 6 สายพันธุ์ ในด้านการให้ปริมาณผลผลิตคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้รับมาจากฟาร์มเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง ให้ผลการทดลองดังนี้

1. **ผลผลิตของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง**

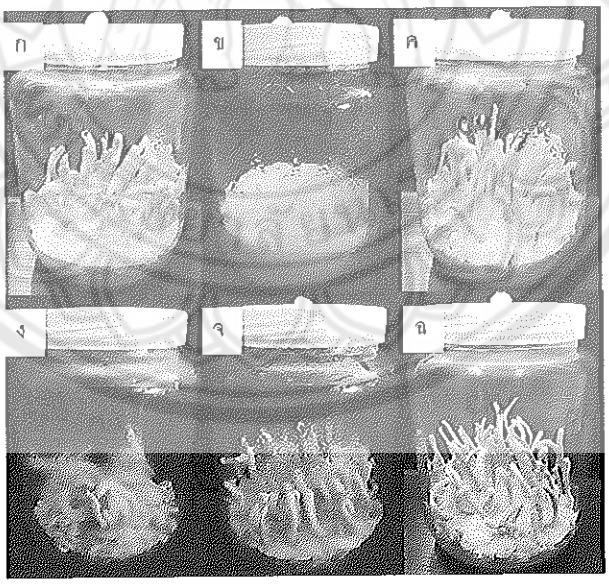
เมื่อนำเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้รับมาจากฟาร์มเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยทั้ง 6 แหล่ง (6 สายพันธุ์) ได้แก่ CM1 กรุงเทพฯ, CM2 กรุงเทพฯ, CM3 ปทุมธานี, CM4 สระบุรี, CM5 เชียงใหม่ และ CM6 สมุทรปราการ มาเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นระยะเวลา 60 วัน ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตของดอกเห็ดเพื่อนำมาประเมินความแตกต่างกันทางด้านผลผลิต พบว่า สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกันให้ผลผลิตที่เป็นจำนวนดอก และน้ำหนักสดได้แตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตาราง 14 โดยสายพันธุ์ CM6 มีจำนวนดอกมากที่สุดเฉลี่ย 62.58 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม รองลงมา ได้แก่ สายพันธุ์ CM3, CM1, CM5 และ CM4 ตามลำดับ โดยมีจำนวนดอกเฉลี่ย 49.87, 46.63, 39.23 และ 28.57 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ CM2 พบว่า มีการเจริญของเส้นใยแต่ไม่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด ดังภาพ 17

ในส่วนของน้ำหนักสด พบว่า ให้ผลที่สัมพันธ์กับปริมาณของดอกเห็ด โดยสายพันธุ์ CM6 ให้น้ำหนักสดมากที่สุดเฉลี่ย 26.39 กรัม ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม รองลงมา ได้แก่ สายพันธุ์ CM3, CM1, CM5 และ CM4 โดยมีปริมาณดอกเฉลี่ย 22.84, 20.88, 16.56 และ 12.77 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 14)

ตาราง 14 ปริมาณดอก (number of stroma) และน้ำหนักสด (fresh weight) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เพาะเลี้ยงได้ในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน

Strain	Number of stroma (Fruiting body/50 g of rice culture)	Fresh weight (g/50 g of rice culture)
CM1 กรุงเทพฯ	46.70 ^{b} ± 2.89	20.88 ^{b} ± 2.76
CM2 กรุงเทพฯ	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก
CM3 ปทุมธานี	49.50 ^{b} ± 1.84	22.84 ^{b} ± 0.91
CM4 สระบุรี	28.88 ^{d} ± 1.09	12.77 ^{d} ± 0.83
CM5 เชียงใหม่	38.40 ^{c} ± 1.05	16.56 ^{c} ± 1.19
CM6 สมุทรปราการ	62.67 ^{a} ± 2.60	26.39 ^{a} ± 1.12

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)



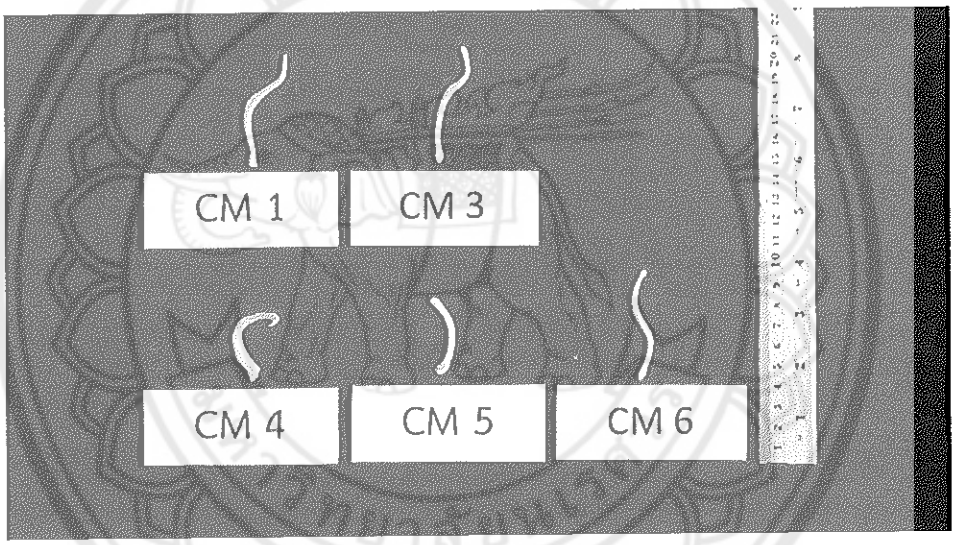
ภาพ 17 ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่เจริญในอาหารข้าว

หมายเหตุ: (ก) CM1 กรุงเทพฯ (ข) CM2 กรุงเทพฯ 2 (ค) CM3 ปทุมธานี (ง) CM4 สระบุรี (จ) CM5 เชียงใหม่ (ฉ) CM6 สมุทรปราการ

2. คุณสมบัติทางกายภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ด 6 สายพันธุ์

2.1 ลักษณะรูปร่างของดอกเห็ด

จากผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์ ด้วยตาเปล่า สามารถแบ่งลักษณะรูปร่างของดอกเห็ด (fruiting bodies) เป็นกลุ่มใหญ่ๆ 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่ดอกเห็ดมีรูปร่างผอมยาว มีส่วนปลายดอกกลมมน ขนาดดอกกว้าง 3.33-4.0 มิลลิเมตร ดอกยาวประมาณ 6.23-7.30 เซนติเมตร ได้แก่ สายพันธุ์ CM1, CM3, CM5 และ CM6 2) กลุ่มที่ดอกเห็ด มีลักษณะรูปร่างอวบ สั้น ปลายแหลม ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 7.66 มิลลิเมตร เมตร ยาว 3.89 เซนติเมตร ได้แก่ สายพันธุ์ CM4 3) กลุ่มที่มีการเจริญของเส้นใยแต่ไม่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด ได้แก่ สายพันธุ์ CM2 ดังภาพ 18 และตาราง 15



ภาพ 18 ขนาดและรูปทรงของดอกเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารข้าว 60 วัน

2.2 ความแน่นเนื้อของดอกเห็ด

จากการศึกษาความแน่นเนื้อของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยนำดอกเห็ด 5 สายพันธุ์ที่มีการเจริญเป็นดอก พบว่า ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM1, CM3, CM5 และ CM6 มีค่าเฉลี่ยความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.24-0.26 นิวตัน (N) ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM4 มีค่าเฉลี่ยความแน่นเนื้อสูงที่สุดเท่ากับ 0.37 N ดังตาราง 15

2.3 สีของดอกเห็ด

ผลการวัดค่าสีของดอกเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ และวัดสีของเส้นใยสายพันธุ์ CM2 เนื่องจากไม่เกิดดอก เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าโดยภาพรวม พบว่า ดอกเห็ดทุกสายพันธุ์มีสีเหลืองแก่ถึงส้ม ส่วนเส้นใยของสายพันธุ์ CM2 มีสีเหลืองอ่อน เมื่อวัดค่าสีโดยรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) พบว่า ค่า L*, a* และ b* ของแต่ละสายพันธุ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่า L* มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อวัดจากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ CM2 โดยมีค่าเฉลี่ย 68.86 รองลงมา คือ ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM4 มีค่าเฉลี่ย 61.86 ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM1, CM3 และ CM5 มีค่า L* ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 54.20, 53.00 และ 54.40 ส่วนดอกเห็ดสายพันธุ์ CM6 มีค่า L* ต่ำสุดโดยมีค่าเฉลี่ย 51.56 สำหรับค่าสีแดง (a*) พบว่า ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM1, CM3, CM5 และ CM6 มีค่า a* สูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย 27.03, 28.60, 28.56 และ 27.46 ส่วนเส้นใยสายพันธุ์ CM2 มีค่า a* ต่ำสุดโดยมีค่าเฉลี่ย 23.26 สำหรับค่าสีเหลือง (b*) พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับค่า a* คือ ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM1, CM3, CM5 และ CM6 มีค่า b* สูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย 47.76, 49.63, 48.70 และ 47.73 ส่วนเส้นใยสายพันธุ์ CM2 มีค่า b* ต่ำสุดโดยมีค่าเฉลี่ย 37.40 (ตาราง 15)

2.4 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compound)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ของดอกเห็ดทั้ง 6 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวนาน 60 วัน โดยสายพันธุ์ CM2 นั้น ได้นำส่วนที่เป็นเส้นใยมาทำการวิเคราะห์ จากการทดลองพบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนที่มีอยู่ในดอกเห็ดแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 65.43-670.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดอกเห็ดสายพันธุ์ CM6 มีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 670.58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนเส้นใยของสายพันธุ์ CM2 มีปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65.43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปิน พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 701.41 ถึง 1,414.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเส้นใยของสายพันธุ์ CM2 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,414.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนดอกเห็ดสายพันธุ์ CM1 และสายพันธุ์ CM5 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่ำที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 751.59 และ 701.41 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตาราง 15)

ตาราง 15 ขนาดของดอกเห็ด (size of fruiting bodies) ความแน่นเนื้อของดอก (firmness) สี (color) ของดอก และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์

Strain	Size of fruiting bodies		Firmness	Color			Bioactive compound	
	Diameter (mm)	Length (cm)	(N)	L*	a*	b*	Adenosine (mg kg^{-1})	Cordycepin (mg kg^{-1})
CM1	3.33 ^{b} ± 1.52	6.50 ^{b} ± 0.26	0.24 ^{b} ± 0.02	54.20 ^{c} ± 0.90	27.03 ^{a} ± 1.76	47.76 ^{a} ± 0.90	486.47 ^{c} ± 10.31	751.59 ^{d} ± 22.53
CM2	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก	68.86 ^{a} ± 1.30	23.26 ^{c} ± 0.61	37.40 ^{c} ± 1.41	65.43 ^{f} ± 4.37	1,414.08 ^{a} ± 90.70
CM3	4.00 ^{b} ± 1.00	6.43 ^{b} ± 0.25	0.25 ^{b} ± 0.02	53.00 ^{cd} ± 0.65	28.56 ^{a} ± 1.12	48.70 ^{a} ± 1.34	561.92 ^{b} ± 11.50	1,201.72 ^{b} ± 18.20
CM4	7.66 ^{a} ± 1.52	4.50 ^{c} ± 0.36	0.37 ^{a} ± 0.01	61.86 ^{b} ± 0.20	25.16 ^{b} ± 0.32	41.53 ^{b} ± 1.13	450.11 ^{d} ± 13.62	1,013.83 ^{c} ± 32.32
CM5	3.66 ^{b} ± 1.15	6.23 ^{b} ± 0.15	0.25 ^{b} ± 0.01	54.40 ^{c} ± 0.98	27.46 ^{a} ± 0.85	47.73 ^{a} ± 0.47	383.68 ^{e} ± 22.59	701.41 ^{d} ± 46.10
CM6	3.66 ^{b} ± 0.57	7.30 ^{a} ± 0.26	0.26 ^{b} ± 0.01	51.56 ^{d} ± 0.81	28.60 ^{a} ± 0.88	49.63 ^{a} ± 0.86	670.58 ^{a} ± 11.76	950.84 ^{c} ± 27.51

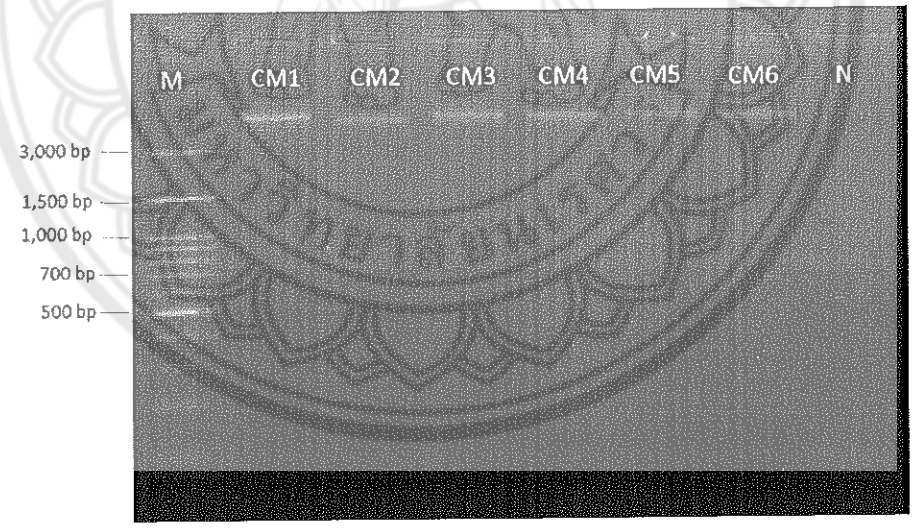
หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองที่ 1 ตอนที่ 2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์ จากฟาร์มเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย จำนวน 6 แหล่ง ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 6 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD ผลการศึกษามีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ผลการสกัดและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพื่อตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอสำหรับใช้ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 6 สายพันธุ์ โดยใช้วิธี Agarose gel electrophoresis ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด innuPREP Plant DNA Kit (Germany) นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาทำการตรวจสอบคุณภาพบนอะกาโรสเจล 0.8% ผลการทดลอง พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ซึ่งมีความคมชัด (clear and sharp) และไม่มีรอยเปื้อน (smear) ดังภาพ 19 ผลการทดลองบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดี และไม่มีการแตกหักเป็นชิ้นเล็ก (Pokorska et al., 2016) เหมาะสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพ 19 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จำนวน 6 สายพันธุ์

หมายเหตุ: CM1 กรุงเทพฯ, CM2 กรุงเทพฯ, CM3 ปทุมธานี, CM4 สระบุรี, CM5 เชียงใหม่ และ CM6 สมุทรปราการ) เมื่อ M = 100 bp DNA ladder marker lane, N = negative control lane

2. ผลการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยเทคนิค RAPD-PCR ด้วย universal primer

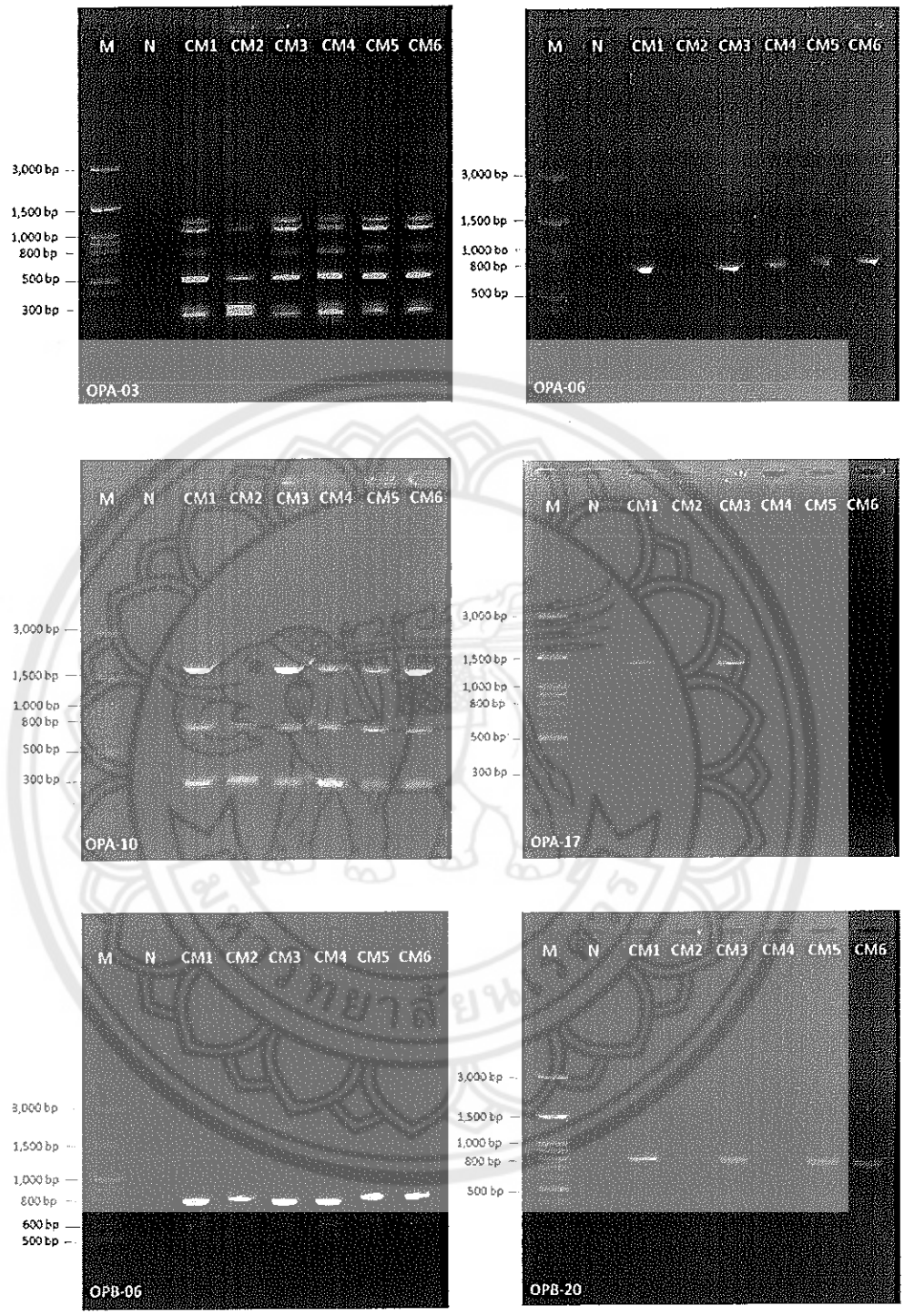
จากการทดลองโดยนำดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่สกัดได้จากข้อ 1 มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดย universal primer จำนวน 25 ไพรเมอร์ (ตาราง 11 ในบทที่ 3) ผลการทดลองพบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (PCR product) รวมทั้งหมด 350 แถบ (loci) โดยสายพันธุ์ CM1 มีจำนวน 69 แถบ สายพันธุ์ CM2 มีจำนวน 47 แถบ สายพันธุ์ CM3 มีจำนวน 58 แถบ สายพันธุ์ CM4 มีจำนวน 61 แถบ สายพันธุ์ CM5 มีจำนวน 60 แถบ และสายพันธุ์ CM6 มีจำนวน 57 แถบ ชนิดของไพรเมอร์ต่อการเกิดแถบดีเอ็นเอ พบว่า ไพร-เมอร์ชนิด OPA-03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอมากที่สุดจำนวน 36 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์ชนิด OPD-03 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์อีกจำนวน 23 ไพรเมอร์ที่เหลือ ปรากฏแถบดีเอ็นเอในบางสายพันธุ์ โดยแสดงผลในตาราง 16 และภาพ 20 ถึง 24

ตาราง 16 จำนวนแถบ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดย universal primer จำนวน 25 ไพรเมอร์

Primer	Number of PCR products found in each strain					
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
OPA-03	6	6	6	6	6	6
OPA-06	1	0	1	1	1	1
OPA-10	3	2	3	3	3	3
OPA-17	2	0	2	0	0	0
OPB-06	1	1	1	1	1	1
OPB-20	1	0	1	0	1	1
OPC-01	3	0	3	2	2	2
OPC-07	4	0	4	4	4	4
OPC-19	4	4	3	5	3	3
OPC-20	2	0	2	3	2	2
OPD-03	0	0	0	0	0	0
OPD-06	0	0	2	0	0	0
OPD-11	3	3	3	3	3	3

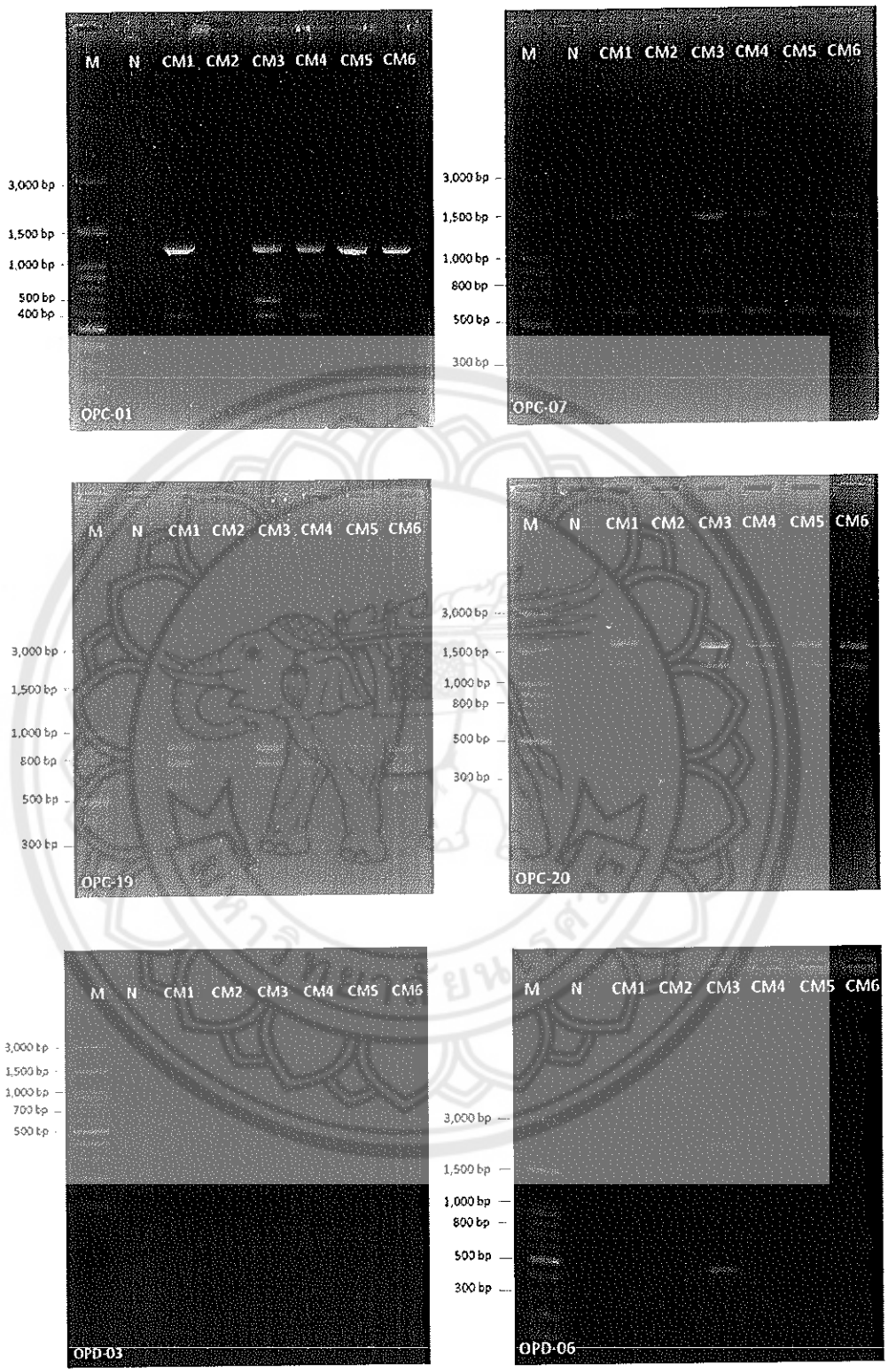
ตาราง 16 (ต่อ)

Primer	Number of PCR products found in each strain					
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
OPE-11	3	4	2	2	3	3
OPE-13	5	5	2	4	5	5
OPF-16	1	1	1	1	1	1
OPF-20	2	2	1	1	1	2
OPG-10	6	2	5	7	5	5
OPG-12	1	1	1	0	1	1
OPH-03	3	2	3	3	3	3
OPJ-14	3	3	2	3	3	3
OPJ-20	5	1	4	4	4	0
OPT-16	4	4	3	3	4	4
OPT-19	3	3	1	3	3	3
OPX-01	3	3	2	2	1	1
Total	69	47	58	61	60	57

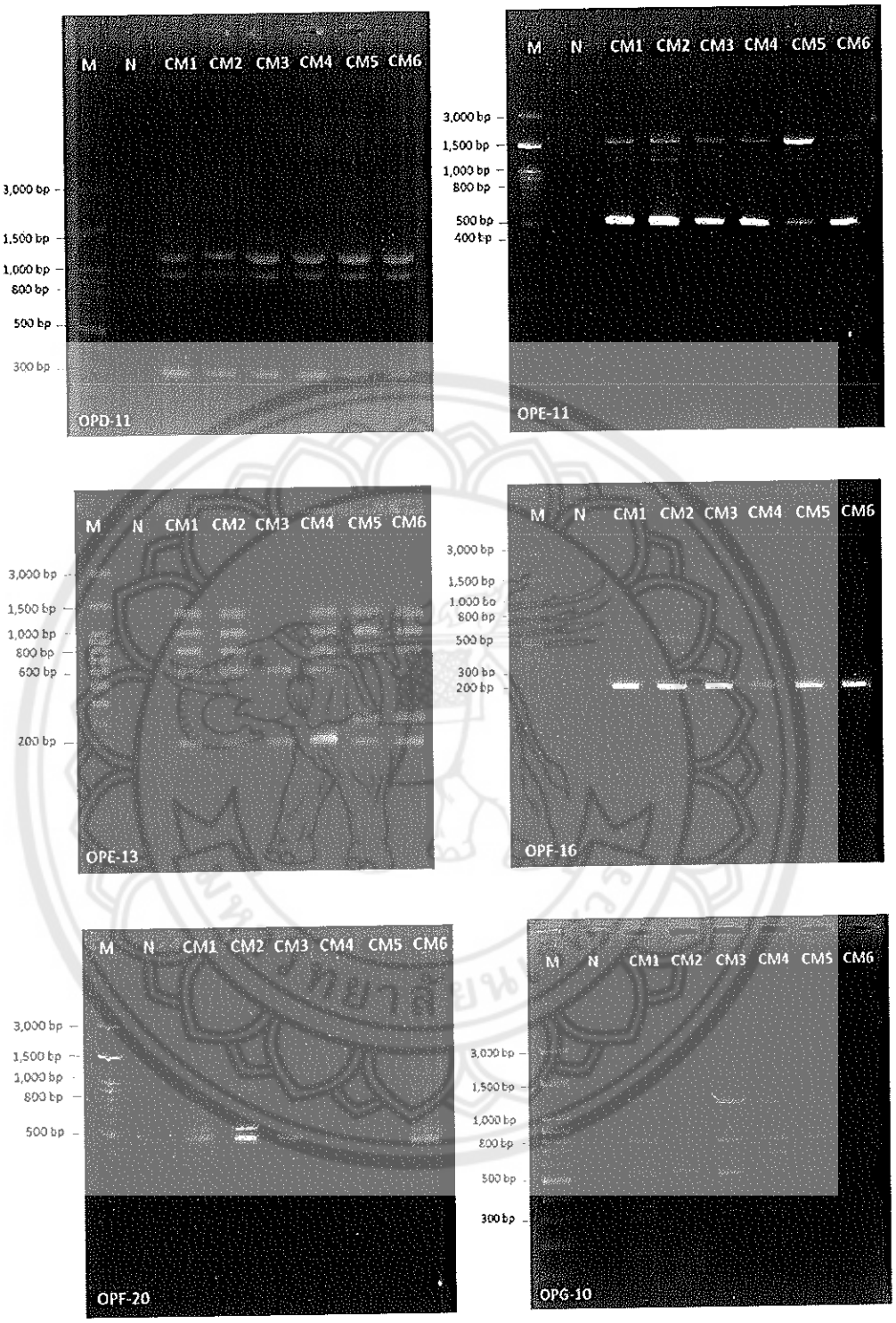


ภาพ 20 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03, OPA-06, OPA-10, OPA-17, OPB-06, และ OPB-20

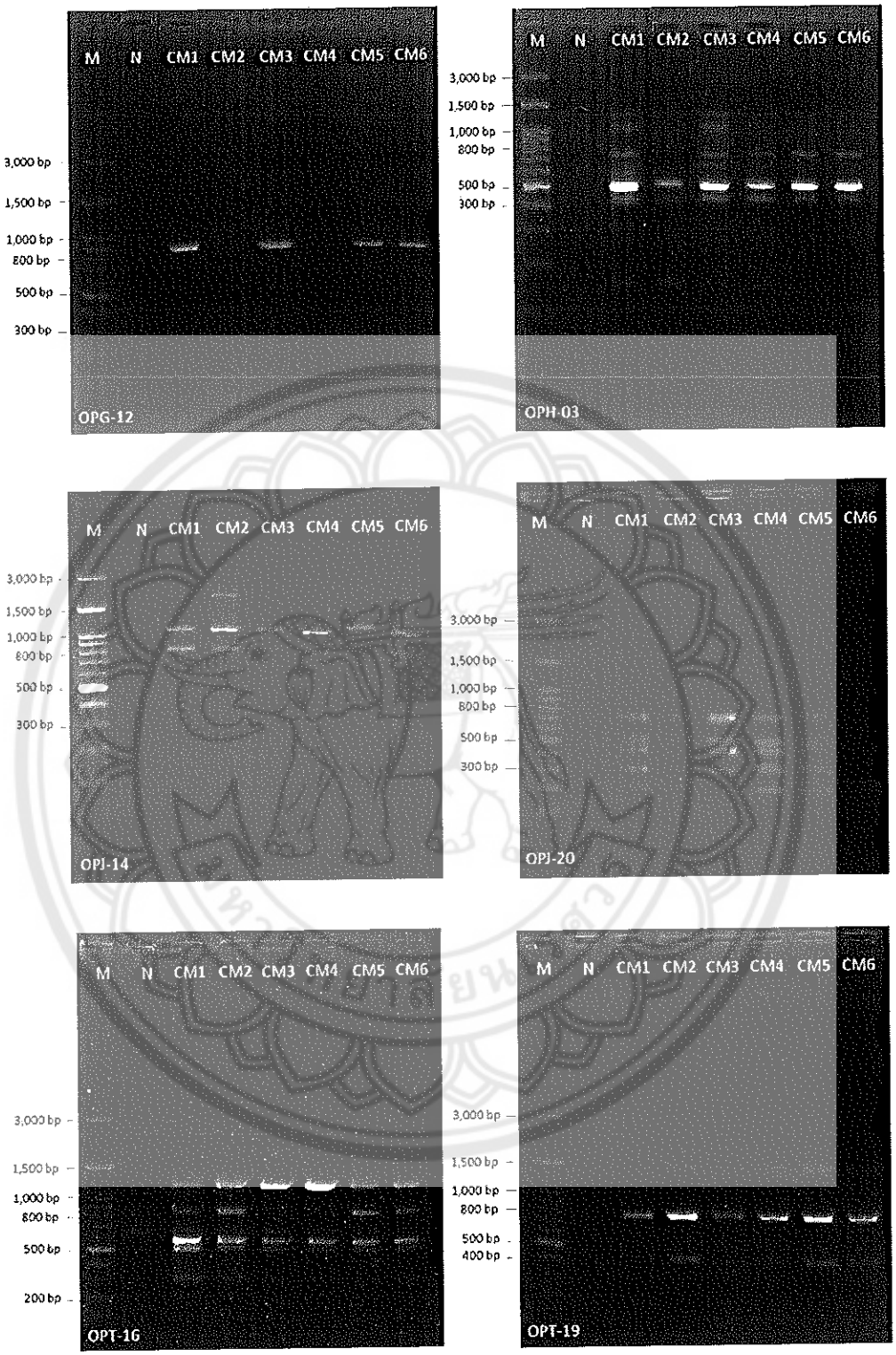
หมายเหตุ: เมื่อ M = 100 bp DNA ladder marker lane, N = negative control lane



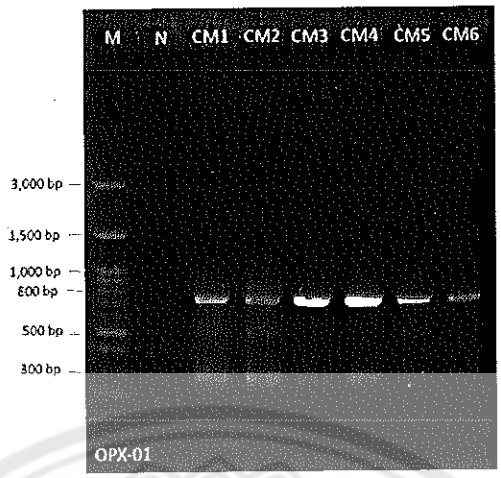
ภาพ 21 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-01, OPC-07, OPC-19, OPC-20 OPD-03 และ OPD-06



ภาพ 22 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPD-11, OPE-11, OPE-13, OPF-16, OPF-20 และ OPG-10



ภาพ 23 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-12, OPH-03, OPJ-14, OPJ-20, OPT-16 และ OPT-19



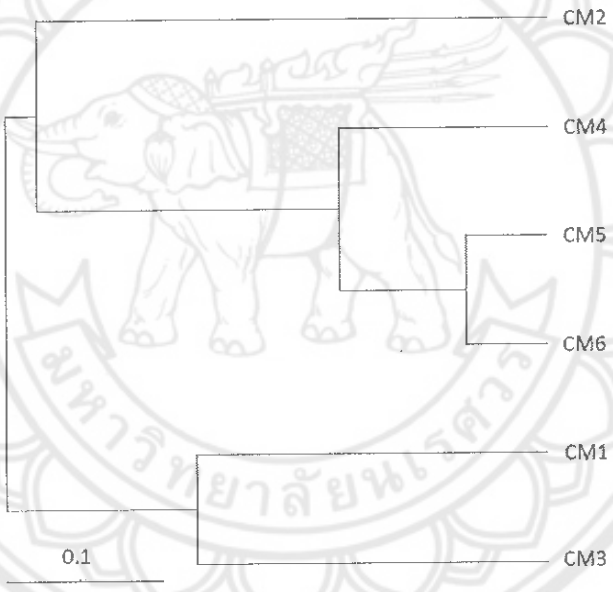
ภาพ 24 จำนวนแถบของ DNA ที่ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ และ OPX-01

3. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

จากการนำแถบดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ได้จากผลการทดลองข้อที่ 2 มาทำการ banding scores โดยพิจารณาจาก (1) เปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอ (DNA pattern) จากภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ว่ามีขนาดดีเอ็นเอเท่าไรโดยเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย (marker) และ (2) ถ้าสายพันธุ์ใดปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ที่ขนาดเท่ากัน) ให้อ่านผลเป็นตัวเลข 1 และถ้าสายพันธุ์ใดไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ที่ขนาดเท่ากัน) ให้อ่านผลเป็นตัวเลข 0 เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป สำเร็จรูป FreeTree ร่วมกับโปรแกรม TreeView พบว่า ขนาดดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้มีขนาดตั้งแต่ 200 ถึง 1500 คู่เบส (ภาพ 21) และเมื่อนำผลคะแนนจากการทำ banding score (ภาคผนวก ข) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.163 ถึง 0.830 ดังตาราง 17 ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ CM1 และ CM3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย 1 ได้แก่ สายพันธุ์ CM2 กลุ่มย่อย 2 ได้แก่ สายพันธุ์ CM4 และกลุ่มย่อย 3 ได้แก่ สายพันธุ์ CM5 และ CM6 ดังภาพ 25 โดยสายพันธุ์ CM5 และ CM6 มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วน CM2 และ CM3 มีความเหมือนทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

ตาราง 17 ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์

	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
CM1	*	0.24937	0.43080	0.39510	0.46378	0.41600
CM2		*	0.16366	0.30688	0.33354	0.41015
CM3			*	0.33073	0.36974	0.32833
CM4				*	0.60636	0.48350
CM5					*	0.83091
CM6						*



ภาพ 25 แผนภูมิความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 6 สายพันธุ์

ผลการทดลองที่ 2 ตอนที่ 1 การศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อการเจริญเติบโต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากการศึกษาสูตรอาหารข้าวต่อการเจริญเติบโตเติบโต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ผลการศึกษาดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อการเจริญของเส้นใยและการพัฒนาเป็นตุ่มดอก

จากการประเมินผลด้านการเจริญเติบโตของเส้นใย ได้แก่ ระยะเวลาในการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเพาะ และระยะเวลาการเกิดตุ่มดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า การเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M12 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 30 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 20 มิลลิลิตร), สูตรอาหาร M11 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 20 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) และสูตรอาหาร M10 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 10 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 40 มิลลิลิตร) ทำให้เส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะเร็วที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 6.50 วัน (สูตรอาหาร M12), 6.50 วัน (สูตรอาหาร M11) และ 6.66 วัน (สูตรอาหาร M10) ตามลำดับ ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 3 สูตรนี้ประกอบด้วยวัตถุดิบชนิดเดียวกันแต่ปริมาณของวัตถุดิบต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการเจริญของเส้นใยทั้ง 3 สูตรกับสูตรอาหารควบคุม (control) (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร) พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสูตรอาหาร control ใช้เวลาในการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเพาะเฉลี่ย 13.66 วัน ส่วนสูตรอาหารที่เส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะช้าที่สุด คือสูตรอาหาร M5 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม น้ำนม 20 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) M4 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม น้ำนม 10 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 40 มิลลิลิตร) และ M6 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม น้ำนม 30 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 20 มิลลิลิตร) โดยใช้เวลาเฉลี่ยเท่ากับ 14.33 วัน (สูตรอาหาร M5) 14.50 วัน (สูตรอาหาร M4) และ 14.50 วัน (สูตรอาหาร M6) ตามลำดับ ดังตาราง 18

จากการศึกษาการพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก พบว่า สูตรอาหาร M12 และสูตรอาหาร M10 ทำให้เส้นใยพัฒนาเป็นตุ่มดอกเร็วที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยใช้เวลาเฉลี่ย 10.50 วัน (สูตรอาหาร M12) และ 11.33 วัน (สูตรอาหาร M10) ตามลำดับ หลังจากหยอดเชื้อ รองลงมาคือสูตรอาหาร M11 ใช้เวลาเฉลี่ย 12.50 วัน ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้จากทั้ง 3 สูตรอาหารเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร control พบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเส้นใยที่เจริญในสูตรอาหาร control มีการพัฒนาไปเป็นตุ่มดอกช้าที่สุดใช้เวลาเฉลี่ย 25 วัน ดังตาราง 18

ตาราง 18 ระยะเวลาในการเจริญของเส้นใย (mycelium growth) **และการเกิดตุ่มดอก** (primordial formation) **เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน**

Formula	Period of growth	
	Mycelium growth (day)	Primordium formation (day)
Control	13.66 ^{a} ± 0.57	21.50 ^{a} ± 0.50
M1	10.50 ^{bc} ± 0.86	15.33 ^{cde} ± 1.25
M2	9.00 ^{d} ± 1.50	13.50 ^{fg} ± 0.50
M3	9.50 ^{cd} ± 0.50	15.83 ^{cd} ± 0.28
M4	14.50 ^{a} ± 0.86	19.83 ^{b} ± 0.28
M5	14.33 ^{a} ± 0.28	19.50 ^{b} ± 0.50
M6	14.50 ^{a} ± 0.50	19.50 ^{b} ± 0.50
M7	13.83 ^{a} ± 0.28	18.83 ^{b} ± 0.28
M8	11.00 ^{b} ± 0.50	16.50 ± 1.00 c
M9	9.33 ± ^{cd} 1.25	15.33 ^{cde} ± 0.28
M10	6.66 ^{e} ± 0.28	11.33 ^{hi} ± 0.28
M11	6.50 ^{e} ± 0.00	12.50 ^{gh} ± 2.59
M12	6.50 ^{e} ± 0.50	10.50 ^{i} ± 0.50
M13	10.50 ^{bc} ± 0.50	14.83 ^{def} ± 0.76
M14	8.83 ^{d} ± 0.57	11.33 ^{hi} ± 0.28
M15	9.83 ^{bcd} ± 0.76	14.50 ^{def} ± 0.50
M16	10.00 ^{bcd} ± 0.00	14.16 ^{ef} ± 0.28

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) Control; rice: PDB, 50:50 (g/mL), M1; rice: egg: PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M2; rice: egg: PDB, 50:20:30 (g/g/mL), M3; rice: egg: PDB, 50: 30: 20 (g/mL/mL), M4; rice: milk: PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M5; rice: milk : PDB, 50: 20: 30 (g/mL/mL), M6; rice: milk: PDB, 50: 20: 30 (g/mL/mL), M7;

rice: egg: milk: PDB, 50: 5: 5: 40 (g/mL/mL/PDB), M8; rice: egg: milk: PDB, 50: 10: 10: 30 (g/mL/mL/mL), M9; rice: egg: milk: PDB, 50: 15: 15: 20 (g/mL/mL/mL), M10; rice: egg: silkworm: PDB, 50: 10: 30: 40 (g/mL/g/mL), M11; rice: egg: silkworm: PDB, 50: 20: 30: 30 (g/mL/g/mL), M12; rice: egg: silkworm: PDB, 50: 30: 30: 20 (g/mL/g/mL), M13; rice: silkworm: milk: PDB, 50: 30:10: 40 (g/g/mL/mL), M14; rice: silkworm: milk: PDB, 50: 30: 20: 30 (g/g/mL/mL), M15; rice: silkworm: milk: PDB, 50: 30: 30: 20 (g/g/mL/mL), M16; rice: silkworm: PDB, 50: 30: 50 (g/mL/g)

2. อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อการให้ผลผลิต ลักษณะรูปทรง และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด

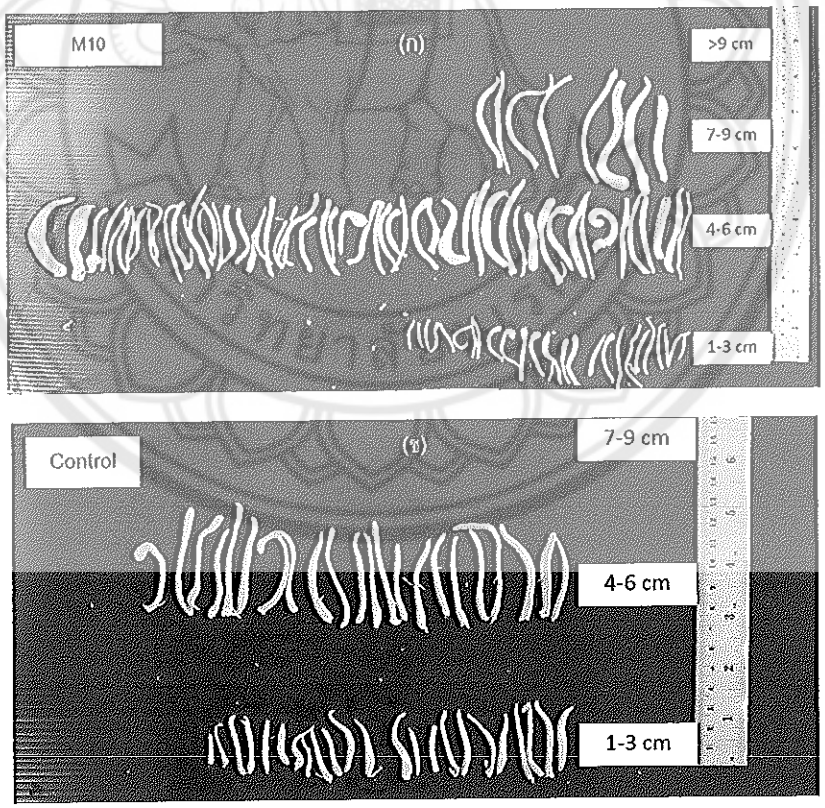
2.1 จำนวนดอกและน้ำหนักสด

จากการศึกษาผลของสูตรอาหารที่แตกต่างกันต่อการผลิตดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง (stroma หรือ fruiting body) พบว่า การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสูตรอาหาร M10 ทำให้มีจำนวนดอกเห็ดเกิดมากที่สุดเฉลี่ย 101 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม และให้น้ำหนักสดเฉลี่ยสูงสุด 40.98 กรัม ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม ส่วนในสูตรอาหาร M14 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม น้ำนม 20 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) พบว่า ให้จำนวนดอกใกล้เคียงกับสูตรอาหาร M10 แต่เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดแล้วพบว่า สูตรอาหาร M14 มีน้ำหนักสดน้อยกว่า โดยมีค่าเฉลี่ย 27.26 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม สูตรอาหารที่ให้ผลผลิตดีรองลงมาคือ สูตรอาหาร M16 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร) โดยให้จำนวนดอกเฉลี่ย 86 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม และให้น้ำหนักสดเฉลี่ย 28.52 กรัม ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม ส่วนสูตรอาหาร control มีจำนวนดอกน้อยที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 35.50 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม และให้น้ำหนักสดน้อยที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.89 กรัม ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม ดังตาราง 19

2.2 ลักษณะรูปทรง ความยาว และเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก

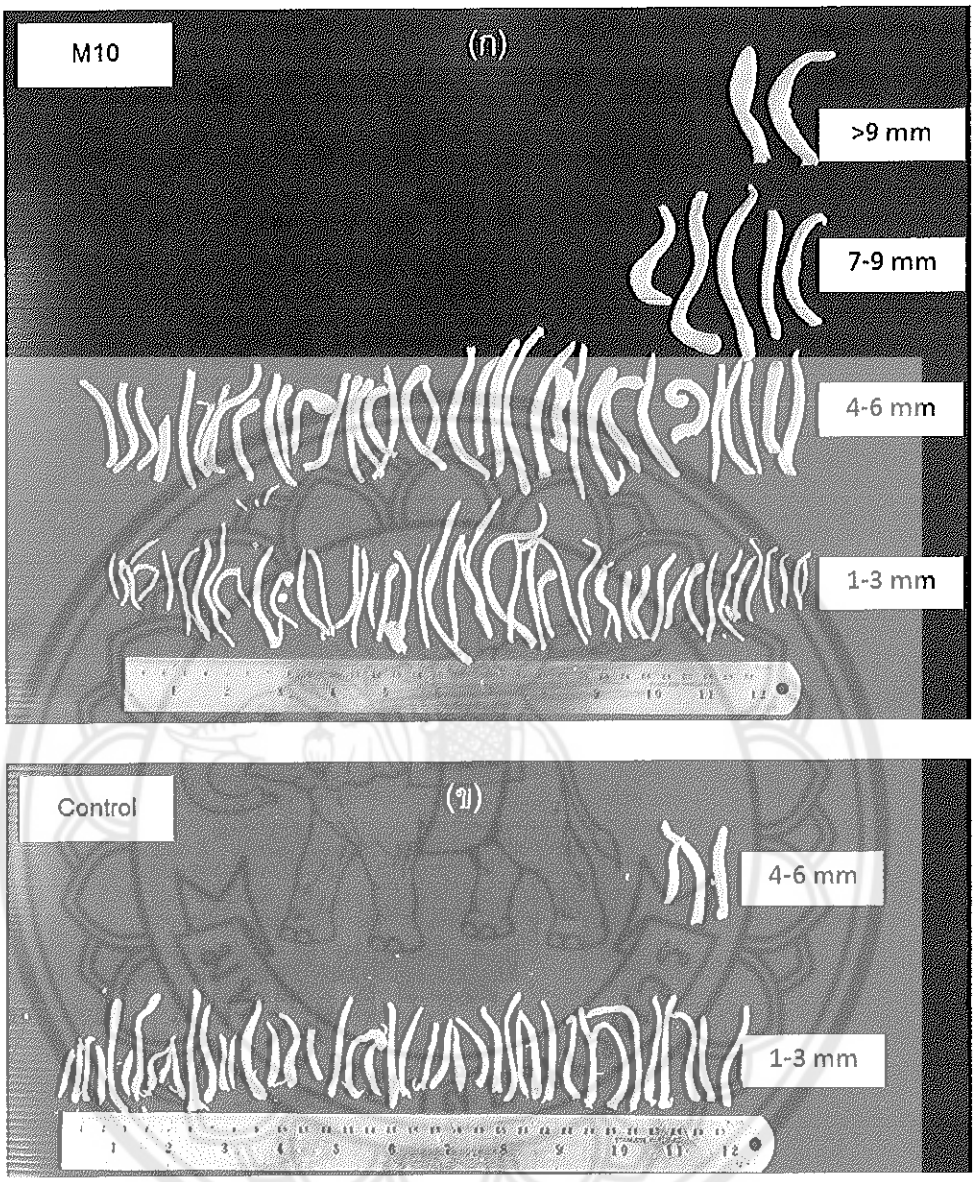
จากการศึกษาผลของสูตรอาหารที่แตกต่างกันต่อความยาวของดอกและความอวบของก้านดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า ลักษณะของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ในทุกสูตรอาหารโดยส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างเหมือนกระบอง ปลายกลมมน แต่มีขนาดที่แตกต่างกันไปตามแต่ละสูตรอาหาร โดยดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M10 พบว่า มีลักษณะก้านดอกยาวและอวบมากกว่าสูตรอาหารอื่นๆ โดยมีขนาดความยาวอยู่ระหว่าง 4-6 เซนติเมตร จำนวนมากที่สุด

(เฉลี่ย 61.50 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม) รองลงมาคือขนาด 1-3 เซนติเมตร (เฉลี่ย 29.50 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม) และขนาด 7-9 เซนติเมตร (เฉลี่ย 8.33 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม) ดังภาพ 26 (ก) และตาราง 19 ส่วนความอวบของก้านดอกโดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางตรงกลางของก้านดอก พบว่า ดอกเห็ดที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของก้านดอกอยู่ระหว่าง 1-3 มิลลิเมตร มีจำนวนมากที่สุด (78.16 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม) รองลงมาคือ ขนาด 4-6 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 20.50 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม) และขนาด 7-9 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 3.66 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม) ดังภาพ 27 (ก) และตาราง 19 สำหรับสูตรอาหาร control ดอกเห็ดส่วนมากมีขนาดความยาวอยู่ระหว่าง 1-3 เซนติเมตร (เฉลี่ย 18.83 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม) รองลงมาคือ ขนาด 4-6 เซนติเมตร (เฉลี่ย 16.5 ดอก ต่อ อาหารเพาะ 50 กรัม) ดังภาพ 26 (ข) ตาราง 19 ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้านดอก พบว่า โดยส่วนใหญ่ดอกเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 31 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม) รองลงมาคือ ขนาด 4-6 มิลลิเมตร (เฉลี่ย 4.33 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม) ดังภาพ 27 (ข) และตาราง 19



ภาพ 26 ความยาวของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

หมายเหตุ: (ก) จากอาหารสูตร M10 (ข) สูตรอาหาร control



ภาพ 27 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

หมายเหตุ: (ก) จากอาหารสูตร M10 (ข) เพาะได้จากในสูตรอาหาร control

ตาราง 19 ผลผลิตของจำนวนดอก (total of fruiting body) น้ำหนักสด (fresh weight) และจำนวนเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแต่ละสูตรอาหารที่มีขนาดความยาว (length) และเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) ที่แตกต่างกัน

Formula	Total of fruiting body (fruiting body/50 g of rice culture)	Fresh weight (g/50 g of rice culture)	Size of fruiting body							
			Length				Diameter			
			1-3 cm	4-6 cm	7-9 cm	>9 cm	1-3 mm	4-6 mm	7-9 mm	>9 mm
Control	35.50 ^{f}	9.89 ^{i}	18.83 ^{c}	16.5 ^{fghi}	0.16 ^{d}	-	31.00 ^{e}	4.33 ^{cd}	0.16 ^{c}	-
M1	48.16 ^{def}	12.64 ^{fghi}	28.66 ^{bc}	18.50 ^{fghi}	1.00 ^{cd}	-	42.16 ^{cde}	4.83 ^{cd}	0.33 ^{c}	0.33 ^{a}
M2	55.66 ^{bcdef}	16.62 ^{efghi}	29.00 ^{bc}	26.00 ^{defgh}	-	-	47.83 ^{bcde}	7.83 ^{bcd}	-	-
M3	42.00 ^{ef}	10.57 ^{hi}	36.83 ^{abc}	7.33 ^{i}	-	-	41.00 ^{de}	1.16 ^{e}	-	-
M4	83.50 ^{abc}	17.23 ^{efghi}	54.66 ^{a}	28.50 ^{cdefgh}	0.33 ^{d}	-	69.83 ^{ab}	12.16 ^{bc}	1.16 ^{bc}	-
M5	52.50 ^{bcdef}	25.37 ^{bcd}	53.33 ^{a}	22.66 ^{efghi}	0.50 ^{cd}	-	63.00 ^{abcd}	13.16 ^{b}	0.16 ^{c}	0.16 ^{a}
M6	46.33 ^{def}	11.24 ^{hi}	38.50 ^{abc}	10.83 ^{hi}	-	-	35.50 ^{e}	10.66 ^{bcd}	0.16 ^{c}	-
M7	75.50 ^{abcde}	17.47 ^{efgh}	48.00 ^{ab}	25.50 ^{defgh}	0.33 ^{d}	-	65.50 ^{abcd}	10.00 ^{bcd}	-	-
M8	51.50 ^{cdef}	11.47 ^{ghi}	36.50 ^{abc}	13.66 ^{ghi}	0.50 ^{cd}	0.16 ^{a}	44.83 ^{cde}	5.83 ^{cde}	0.16 ^{c}	0.33 ^{a}
M9	51.16 ^{cdef}	13.41 ^{efghi}	20.16 ^{c}	21.83 ^{efghi}	1.16 ^{cd}	0.33 ^{a}	36.50 ^{e}	6.16 ^{cde}	0.33 ^{c}	0.50 ^{a}
M10	101.00 ^{a}	40.98 ^{a}	29.50 ^{bc}	61.50 ^{a}	8.33 ^{a}	-	78.16 ^{a}	20.50 ^{a}	3.66 ^{a}	-
M11	61.16 ^{bcdef}	20.59 ^{cde}	22.33 ^{c}	34.33 ^{cdef}	4.33 ^{abcd}	0.16 ^{a}	51.33 ^{bcde}	8.66 ^{bcd}	0.66 ^{bc}	0.50 ^{a}
M12	66.16 ^{bcde}	18.79 ^{def}	26.33 ^{c}	37.66 ^{cde}	1.66 ^{bcd}	-	54.83 ^{abcde}	10.33 ^{bcd}	0.50 ^{bc}	-

ตาราง 19 (ต่อ)

Formula	Total of fruiting body (fruiting body/50 g of rice culture)	Fresh weight (g/50 g of rice culture)	Size of fruiting body							
			Length				Diameter			
			1-3 cm	4-6 cm	7-9 cm	>9 cm	1-3 mm	4-6 mm	7-9 mm	>9 mm
M13	64.50 ^{bcde}	19.17 ^{def}	32.33 ^{bc}	30.00 ^{cdefgh}	2.16 ^{bcd}	-	54.66 ^{abcde}	9.33 ^{bcd}	0.50 ^{bc}	-
M14	101.66 ^{a}	27.26 ^{bc}	55.50 ^{a}	41.33 ^{bcd}	4.83 ^{abc}	-	76.83 ^{a}	20.50 ^{a}	3.33 ^{a}	1.00 ^{a}
M15	77.36 ^{abcd}	24.90 ^{bcd}	30.66 ^{bc}	44.33 ^{bc}	2.33 ^{bcd}	-	66.50 ^{abc}	8.33 ^{bcd}	2.66 ^{ab}	0.50 ^{a}
M16	86.00 ^{ab}	28.52 ^{b}	26.16 ^{c}	56.83 ^{ab}	5.66 ^{ab}	-	76.83 ^{a}	10.16 ^{bcd}	1.00 ^{bc}	0.66 ^{a}

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

Control; rice : PDB, 50:50 (g/mL), M1; rice : egg : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M2; rice : egg : PDB, 50:20:30 (g/g/mL), M3; rice : egg : PDB, 50:30:20 (g/mL/mL), M4; rice : milk : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M5; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M6; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M7; rice : egg : milk : PDB, 50:5:5:40 (g/mL/mL/PDB), M8; rice : egg : milk : PDB, 50:10:10:30 (g/mL/mL/mL), M9; rice : egg : milk : PDB, 50:15:15:20 (g/mL/mL/mL), M10; rice : egg : silkworm : PDB, 50:10:30:40 (g/mL/g/mL), M11; rice : egg : silkworm : PDB, 50:20:30:30 (g/mL/g/mL), M12; rice : egg : silkworm : PDB, 50:30:30:20 (g/mL/g/mL), M13; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:10:40 (g/g/mL/mL), M14; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:20:30 (g/g/mL/mL), M15; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:30:20 (g/g/mL/mL), M16; rice : silkworm : PDB, 50:30:50 (g/mL/g)

2.3 ค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ด

จากการตรวจวัดหาค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า ค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ดที่วัดได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.18-0.39 นิวตัน (N) โดยดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M7 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม, ไข่ดิบ 5 มิลลิลิตร, น้ำนม 5 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 40 มิลลิลิตร), M10, M14 และ M16 มีค่าเฉลี่ยความแน่นเนื้อสูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38, 0.39, 0.33 และ 0.32 N ตามลำดับ ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร control มีค่าความแน่นเนื้อน้อยที่สุดเท่ากับ 0.18 N ดังตาราง 20

2.4 สีของดอกเห็ด

จากการตรวจวัดสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน เมื่อมองด้วยตาเปล่า พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้ในทุกสูตรอาหารให้สีที่ไม่แตกต่างกัน คือ ดอกเห็ดมีสีเหลืองถึงส้มเหมือนกัน เมื่อนำดอกเห็ดมาวัดค่าสีโดยรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*), ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) พบว่า ค่าความสว่าง (L*) มีค่าอยู่ระหว่าง 35.33-42.00 โดย ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M7 มีค่า L* มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย 42.00 ส่วนดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M2 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 20 มิลลิลิตร และอาหาร PDB 30 มิลลิลิตร) มีค่า L* น้อยที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 35.33 ดังตาราง 20

สำหรับการตรวจวัดค่าสีแดง (a*) พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีค่าสีแดง (a*) อยู่ระหว่าง (21.03-25.86) โดยดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M8 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 10 มิลลิลิตร น้ำนม 10 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) และสูตรอาหาร M3 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 30 มิลลิลิตร และอาหาร PDB 20 มิลลิลิตร) ให้ค่า a* มากที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย 25.86 และ 25.26 ตามลำดับ ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M16 ให้ค่า a* น้อยที่สุดเฉลี่ย 21.03 ดังตาราง 20

สำหรับการตรวจหาค่าสีเหลือง (b*) พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีค่าสีเหลือง (b*) ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ระหว่าง (48.50-52.43) โดยดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M8 ให้ค่า b* สูงที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 52.43 ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M2 ให้ค่า b* ต่ำที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 48.50 ดังตาราง 20

2.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS)

จากการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันมีค่าเฉลี่ยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12.73-13.16% โดยดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M1, M4, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14 และ M16 มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย 13.16%, 13.06%, 13.16%, 13.13%, 13.16%, 13.16%, 13.13%, 13.13%, 13.16%, 13.10% และ 13.16% ตามลำดับ ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M2, M3, M5, M6, M15 และ control มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดต่ำที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.83%, 12.90%, 12.73%, 12.83% และ 12.73% ตามลำดับ ดังตาราง 20

3. อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ 2 ชนิดคือ สารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหารที่แตกต่างกันเป็นเวลา 63 วัน หลังจากหยอดเชื้อ พบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 623.21-1,259.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M4 และ M16 มีปริมาณสารอะดีโนซินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,259.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สูตรอาหาร M4) และ 1,214.82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สูตรอาหาร M16) ตามลำดับ รองลงมาคือสูตรอาหาร M10 มีค่าเฉลี่ย 1,166.59 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M3 พบปริมาณสารอะดีโนซีนน้อยที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 623.21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร control โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 663.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตาราง 21

สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่วัดได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1,781.97-4,799.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M10 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4,799.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือสูตรอาหาร M16 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4,514.22 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M7 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่ำที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,781.97 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตาราง 21

ตาราง 20 อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ค่าสี (color) และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Formula	Firmness (kg cm^{-2})	Color			TSS (%)
		L*	a*	b*	
Control	0.18 ^{h} ± 0.02	37.26 ^{efg} ± 0.58	24.23 ^{bcd} ± 0.77	49.70 ^{cde} ± 1.10	12.73 ^{d} ± 0.15
M1	0.23 ^{fgh} ± 0.04	36.06 ^{gh} ± 0.30	23.70 ^{cdef} ± 0.30	50.20 ^{bcde} ± 0.45	13.16 ^{a} ± 0.57
M2	0.26 ^{defgh} ± 0.05	35.33 ^{h} ± 0.45	24.60 ^{bc} ± 0.55	48.50 ^{e} ± 1.85	12.83 ^{cd} ± 0.57
M3	0.20 ^{gh} ± 0.03	38.70 ^{cde} ± 0.75	25.26 ^{ab} ± 0.20	51.73 ^{abc} ± 0.50	12.90 ^{cd} ± 0.10
M4	0.27 ^{cdefg} ± 0.10	39.10 ^{bcd} ± 0.87	23.13 ^{defg} ± 0.37	52.33 ^{ab} ± 1.20	13.06 ^{ab} ± 0.15
M5	0.24 ^{efgh} ± 0.07	40.76 ^{ab} ± 0.57	23.16 ^{defg} ± 0.66	50.36 ^{abcde} ± 0.40	12.73 ^{d} ± 0.05
M6	0.26 ^{defgh} ± 0.04	39.93 ^{bc} ± 1.34	24.66 ^{bg} ± 1.10	50.63 ^{abcd} ± 1.20	12.93 ^{bc} ± 0.05
M7	0.38 ^{ab} ± 0.19	42.00 ^{a} ± 0.81	22.70 ^{fg} ± 0.45	50.93 ^{abc} ± 1.78	13.16 ^{a} ± 0.05
M8	0.30 ^{bcdef} ± 0.04	39.10 ^{bcd} ± 1.44	25.86 ^{a} ± 0.83	52.43 ^{a} ± 0.40	13.13 ^{a} ± 0.15
M9	0.26 ^{defgh} ± 0.04	37.20 ^{efg} ± 0.95	23.73 ^{cdef} ± 0.49	48.60 ^{de} ± 1.12	13.16 ^{a} ± 0.05
M10	0.39 ^{a} ± 0.01	37.43 ^{defg} ± 0.41	22.03 ^{gh} ± 0.85	50.36 ^{abcde} ± 0.97	13.16 ^{a} ± 0.05
M11	0.35 ^{abc} ± 0.30	36.63 ^{fgh} ± 0.75	22.86 ^{efg} ± 0.23	50.73 ^{abc} ± 0.70	13.13 ^{a} ± 0.05
M12	0.27 ^{cdefg} ± 0.00	36.36 ^{gh} ± 1.52	23.53 ^{cdef} ± 0.37	50.36 ^{abcde} ± 0.68	13.13 ^{a} ± 0.11
M13	0.28 ^{cdefg} ± 0.47	38.80 ^{cde} ± 0.52	23.60 ^{cdef} ± 0.98	50.56 ^{abcde} ± 0.61	13.16 ^{a} ± 0.05
M14	0.33 ^{abcd} ± 0.12	38.23 ^{cdef} ± 1.52	24.30 ^{bcd} ± 1.21	51.66 ^{abc} ± 1.44	13.10 ^{a} ± 0.10
M15	0.22 ^{fgh} ± 0.52	36.06 ^{gh} ± 0.96	24.13 ^{bcde} ± 0.70	48.56 ^{de} ± 1.28	12.83 ^{cd} ± 0.50
M16	0.32 ^{abcde} ± 0.15	38.26 ^{cdef} ± 0.73	21.03 ^{h} ± 0.23	51.16 ^{abg} ± 1.16	13.16 ^{a} ± 0.50

หมายเหตุ: $^{a\,b\,c}$ ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) Control; rice : PDB, 50:50 (g/mL), M1; rice : egg : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M2; rice : egg : PDB, 50:20:30 (g/g/mL), M3; rice : egg : PDB, 50:30:20 (g/mL/mL), M4; rice : milk : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M5; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M6; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M7; rice : egg : milk : PDB, 50:5:5:40 (g/mL/mL/PDB), M8; rice : egg : milk : PDB, 50:10:10:30 (g/mL/mL/mL), M9; rice : egg : milk : PDB, 50:15:15:20 (g/mL/mL/mL), M10; rice : egg : silkworm : PDB, 50:10:30:40 (g/mL/g/mL), M11; rice : egg : silkworm : PDB, 50:20:30:30 (g/mL/g/mL), M12; rice : egg : silkworm : PDB, 50:30:30:20 (g/mL/g/mL), M13; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:10:40

(g/g/mL/mL), M14; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:20:30 (g/g/mL/mL), M15; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:30:20 (g/g/mL/mL), M16; rice : silkworm : PDB, 50:30:50 (g/mL/g)

ตาราง 21 อิทธิพลของสูตรอาหารข้าวต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Formula	Bioactive compound	
	Adenosine (mg kg^{-1})	Cordycepin (mg kg^{-1})
Control	663.16 ^{ij}± 3.30	2,443.48 ^{g}± 10.88
M1	824.09 ^{fgh}± 76.27	2,869.33 ^{f}± 104.79
M2	903.74 ^{defg}± 19.98	3,395.50 ^{d}± 57.20
M3	623.21 ^{j}± 29.28	3,108.30 ^{e}± 53.53
M4	1,259.81 ^{a}± 9.39	2,909.28 ^{f}± 47.55
M5	925.27 ^{de}± 18.23	3,226.03 ^{de}± 85.77
M6	976.35 ^{cd}± 2.37	2,862.18 ^{f}± 108.35
M7	861.34 ^{efg}± 24.28	1,781.97 ^{j}± 56.07
M8	909.31 ^{def}± 52.66	2,771.96 ^{f}± 142.62
M9	652.28 ^{ij}± 75.20	2,009.28 ^{i}± 23.84
M10	1,166.59 ^{b}± 22.89	4,799.32 ^{a}± 9.22
M11	811.69 ^{gh}± 4.163	2,393.81 ^{gh}± 20.87
M12	1,018.37 ^{c}± 34.97	2,321.41 ^{gh}± 43.23
M13	1,057.77 ^{c}± 27.46	4,270.25 ^{c}± 63.35
M14	738.65 ^{hi}± 104.12	3,377.56 ^{d}± 322.82
M15	870.77 ^{efg}± 54.06	2,235.11 ^{h}± 11.56
M16	1,214.82 ^{ab}± 111.70	4514.22 ^{b}± 57.86

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

Control; rice : PDB, 50:50 (g/mL), M1; rice : egg : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M2; rice : egg : PDB, 50:20:30 (g/g/mL), M3; rice : egg : PDB, 50:30:20 (g/mL/mL), M4; rice : milk : PDB, 50:10:40 (g/mL/mL), M5; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M6; rice : milk : PDB, 50:20:30 (g/mL/mL), M7; rice : egg : milk : PDB, 50:5:5:40 (g/mL/mL/PDB), M8; rice : egg : milk : PDB, 50:10:10:30 (g/mL/mL/mL), M9; rice : egg : milk : PDB, 50:15:15:20 (g/mL/mL/mL), M10; rice : egg : silkworm : PDB, 50:10:30:40 (g/mL/g/mL), M11; rice : egg : silkworm : PDB, 50:20:30:30 (g/mL/g/mL), M12; rice : egg : silkworm : PDB, 50:30:30:20 (g/mL/g/mL), M13; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:10:40 (g/g/mL/mL), M14; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:20:30 (g/g/mL/mL), M15; rice : silkworm : milk : PDB, 50:30:30:20 (g/g/mL/mL), M16; rice : silkworm : PDB, 50:30:50 (g/mL/g)

4. **องค์ประกอบทางเคมีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง**

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร ประเทศไทย ลงในสูตรอาหาร M10 เป็นเวลา 63 วัน แล้วทำการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า องค์ประกอบทางเคมีต่อตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าบดแห้ง 100 กรัม ประกอบด้วย พลังงาน 370 กิโลแคลอรี ไขมันทั้งหมด 3.98 กรัม โปรตีน 40.64 กรัม คาร์โบไฮเดรต 42.99 กรัม ความชื้น 8.3 กรัม เถ้า 4.09 กรัม ใยอาหาร 18.7 กรัม และน้ำตาล 16.44 กรัม ดังตาราง 22

ตาราง 22 องค์ประกอบทางเคมีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M10

องค์ประกอบ	ปริมาณสารอาหาร (ต่อ 100 กรัม)
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	370
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	3.98
โปรตีน (กรัม)	40.64
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	42.99
ความชื้น/น้ำ (กรัม)	8.3
เถ้า (กรัม)	4.09
ใยอาหาร (กรัม)	18.7
น้ำตาล (กรัม)	16.44

หมายเหตุ: วิเคราะห์โดยวิธีของ AOAC (2005)

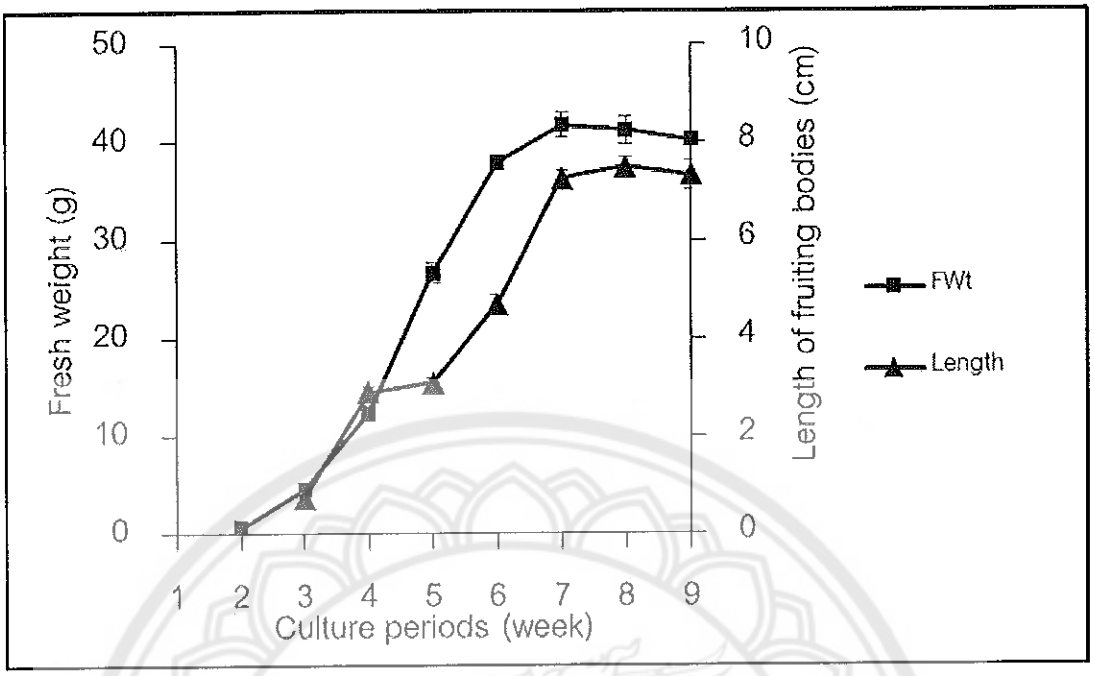
ผลการทดลองที่ 2 ตอนที่ 2 ผลการศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาที่เหมาะสม ในการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสูตรอาหาร M10 ต่อการเจริญเติบโต คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดอกเห็ด และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ให้ผลการทดลองดังนี้

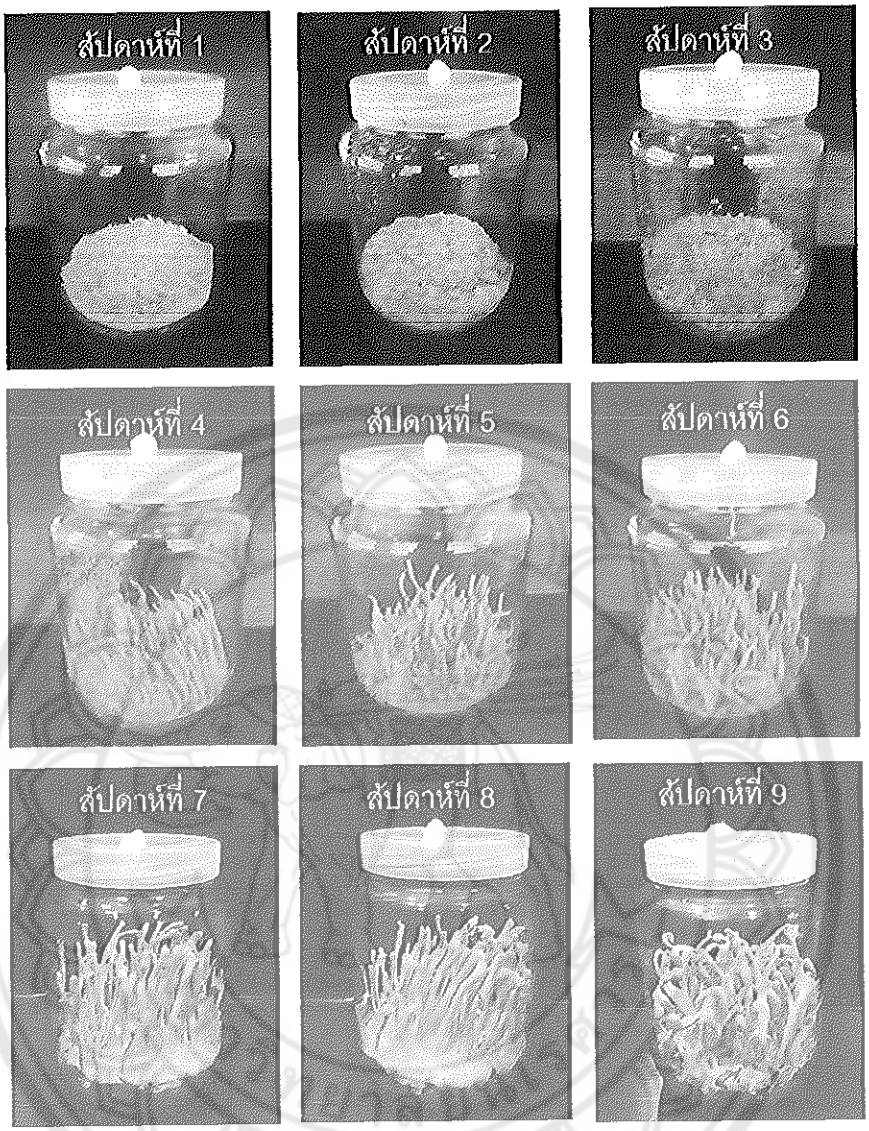
1. อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดและความยาวของดอก

จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารสูตร M10 เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ พบว่า เส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะเลี้ยงใช้ระยะเวลา 6.60 วัน หลังจากหยอดเชื้อ และเริ่มเกิดเป็นตุ่มดอกเล็กๆ ใช้ระยะเวลา 11.30 วัน จากนั้นเริ่มทำการวัดน้ำหนักสดของดอกเห็ดเมื่อเพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากหยอดเชื้อ เนื่องจากตุ่มดอกเริ่มมีการเจริญเติบโตยืดยาวขึ้นเล็กน้อยในช่วงเวลาดังกล่าว จากการทดลองพบว่า น้ำหนักสดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น และจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 7 จนถึงสัปดาห์สุดท้ายคือสัปดาห์ที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 2 วัดได้ 0.62 กรัม ต่อ 50 กรัมของอาหารเพาะ และในสัปดาห์ที่ 7, 8 และ 9 วัดได้ 41.77, 41.20, และ 40.27 กรัม ต่อ 50 กรัมของอาหารเพาะ ตามลำดับ ดังภาพ 28

สำหรับความยาวของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ทำการวัดความยาวของดอก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากหยอดเชื้อ เนื่องจากดอกเห็ดหรือสโตรมาเริ่มยาวขึ้นพอที่จะสามารถเริ่มวัดได้ในช่วงเวลาดังกล่าว จากการทดลองพบว่า ดอกเห็ดมีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอกยาว โดยมีความยาวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น และจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 7 จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสด โดยในสัปดาห์ที่ 3 วัดความยาวของดอกเห็ดได้ 0.73 เซนติเมตร และในสัปดาห์ที่ 7, 8 และ 9 วัดได้ 7.26, 7.50 และ 7.33 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังภาพ 28 และภาพ 29



ภาพ 28 อิทธิพลของระยะเวลา (culture period) ต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก**สด** (fresh weight) และความยาว (length) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์จาก**กรมวิชา**การเกษตร ที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10



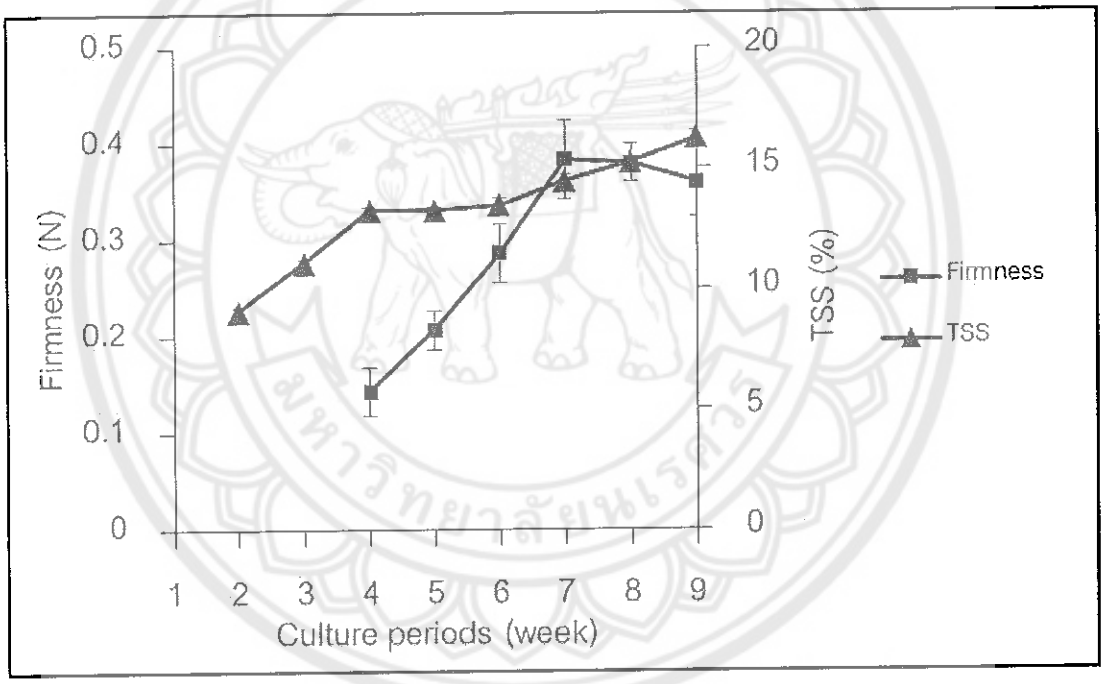
ภาพ 29 การเจริญเติบโตของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10 ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

2. อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อ ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) และค่าสี

สำหรับค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้เริ่มทำการวัดในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากหยอดเชื้อ เนื่องจากดอกเริ่มมีขนาดรูปร่างที่เหมาะสมต่อการวัดด้วยเครื่องมือในช่วงเวลาดังกล่าว จากการทดลองพบว่า ดอกเห็ดมีค่าความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น และจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 7 จนถึงสัปดาห์ที่ 8 และเริ่มมีค่าลดลงในสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 4 วัดค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ดได้

0.14 นิวตัน (N) และในสัปดาห์ที่ 7, 8 และ 9 วัดค่าความแน่นเนื้อได้ 0.38, 0.38 และ 0.36 นิวตัน (N) ตามลำดับ ดังภาพ 30

สำหรับค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid; TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้เริ่มทำการวัดในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากหยอดเชื้อ เนื่องจากเป็นช่วงที่ไมซีเลียมได้พัฒนาเป็นตุ่มดอกแล้วและสามารถเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดค่า TSS ได้ จากการทดลองพบว่า ดอกเห็ดมีค่า TSS เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น และจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์ที่ 6 โดยในสัปดาห์ที่ 2 วัดค่า TSS ของดอกเห็ดได้ 9.06% ส่วนในสัปดาห์ที่ 4, 5 และ 6 วัดค่า TSS ได้ 13.26%, 13.26% และ 13.46% ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 9 วัดค่า TSS ได้ 16.26% ดังภาพ 30

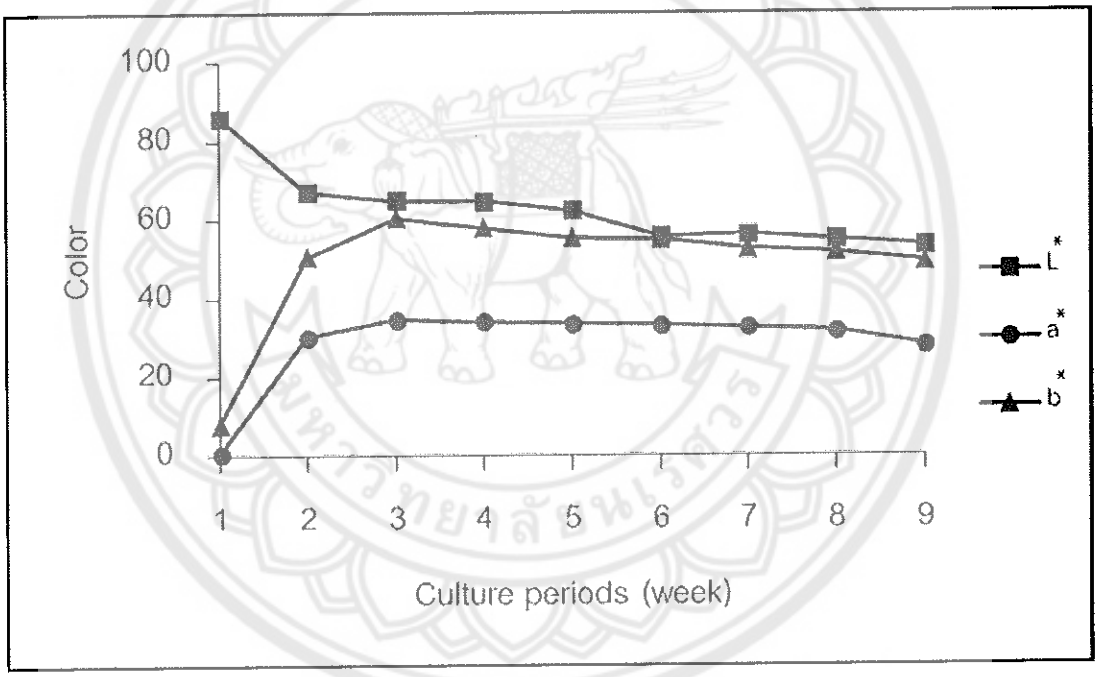


ภาพ 30 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนค่าความแน่นเนื้อ (firmness) และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10

สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้รายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*), ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) โดยเริ่มทำการวัดค่าสีดังกล่าวตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังจากหยอดเชื้อ จากการทดลองพบว่า ค่าความสว่าง (L*) มีค่าลดลงอย่างมากในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 2 โดยสัปดาห์ที่ 1 วัดค่า L* ได้สูงสุดเท่ากับ 86.06 ในสัปดาห์ที่ 2 วัดค่า L* ได้เท่ากับ

67.16 หลังจากนั้นมีค่าลดลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 9 วัดค่า L* ได้เท่ากับ 53.40 ดังภาพ 31

สำหรับการเปลี่ยนของค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า ค่า a* และ b* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นมากจากสัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 3 โดยในสัปดาห์ที่ 1 วัดค่า a* และ b* ได้เท่ากับ 0.73 และ 8.03 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 3 วัดค่า a* และ b* ได้เท่ากับ 34.53 และ 60.46 ตามลำดับ จากนั้นเริ่มคงที่จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 8 และเริ่มมีค่าลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 8 วัดค่า a* และ b* ได้เท่ากับ 31.60 และ 51.76 ตามลำดับ และในสัปดาห์ที่ 9 วัดค่า a* และ b* ได้เท่ากับ 27.90 และ 49.23 ตามลำดับ ดังภาพ 31

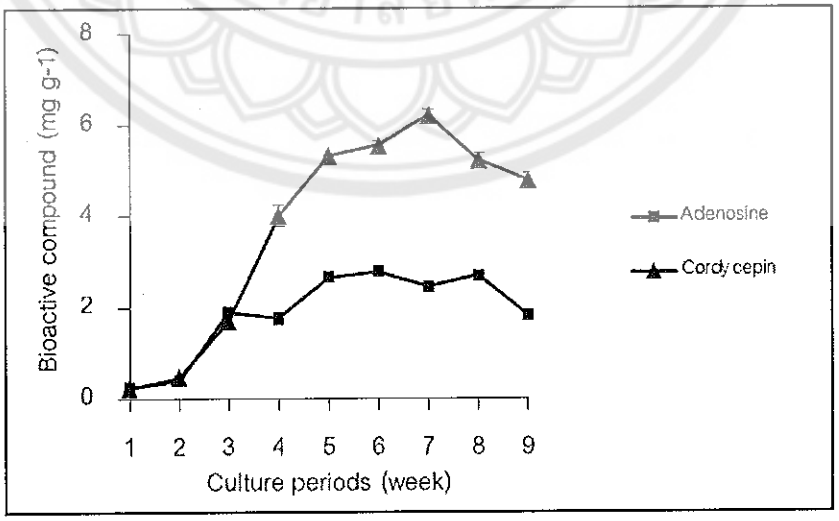


ภาพ 31 อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนค่าสี (color) ได้แก่ ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10

3. อิทธิพลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ 2 ชนิดคือ สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน โดยทำการวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังจากหยอดเชื้อ เนื่องจากเป็นช่วงที่เริ่มสามารถนำเส้นใยมาเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงของสารอะดีโนซีนโดยภาพรวมมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น และเริ่มคงที่ในช่วงสัปดาห์ที่ 5 ถึงสัปดาห์ที่ 8 โดยในสัปดาห์ที่ 2 วัดปริมาณสารอะดีโนซีนได้ 254.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg kg^{-1}) ในสัปดาห์ที่ 5 วัดปริมาณสารอะดีโนซีนได้ 2,668.54 mg kg^{-1} และในสัปดาห์ที่ 8 วัดปริมาณสารอะดีโนซีนได้ 2,703.47 mg kg^{-1} หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงในสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 9 วัดปริมาณสารอะดีโนซีนได้ 1,835.35 mg kg^{-1} ดังภาพ 32

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสารคอร์ไดเซปินโดยภาพรวม พบว่า ให้ผลในลักษณะคล้ายกันกับการเปลี่ยนแปลงของสารอะดีโนซีน คือ ปริมาณสารคอร์ไดเซปินมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น โดยมีค่าสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 7 โดยสัปดาห์ที่ 2 วัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินได้เท่ากับ 223.87 mg kg^{-1} และในสัปดาห์ที่ 7 วัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินได้เท่ากับ 6,218.56 mg kg^{-1} หลังจากนั้นปริมาณสารคอร์ไดเซปินเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 และสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยในสัปดาห์ที่ 8 และสัปดาห์ที่ 9 วัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินได้เท่ากับ 5,230.18 mg kg^{-1} และ 4,796.32 mg kg^{-1} ตามลำดับ ดังภาพ 32



ภาพ 32 อิทธิพลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนค่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10

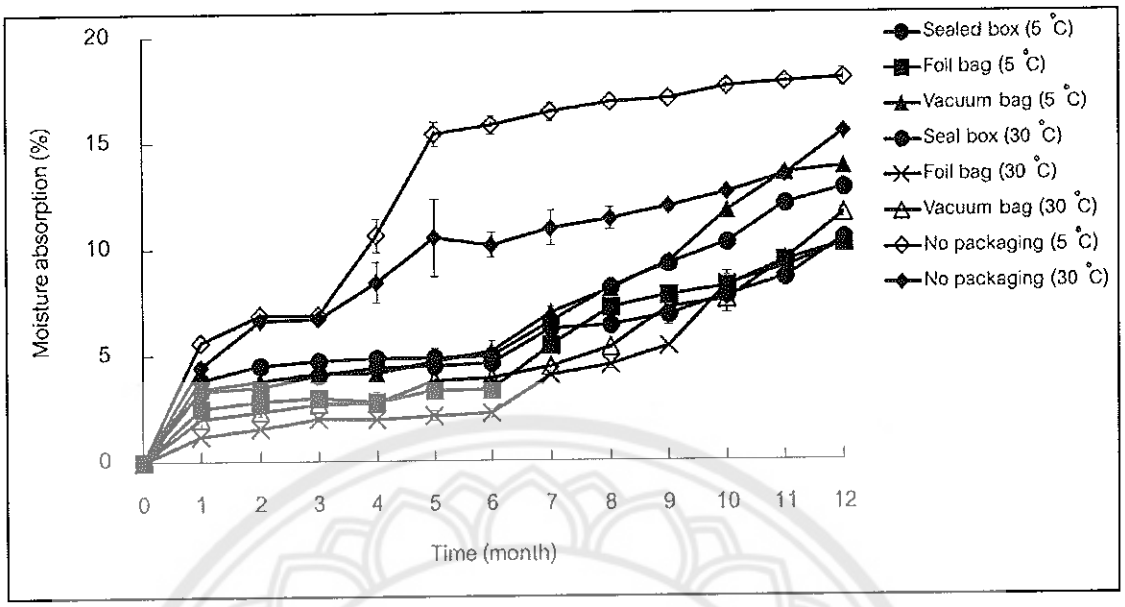
ผลการทดลองที่ 3 ผลการศึกษาอิทธิพลของบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ

จากการศึกษาทดลองการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กล่องพลาสติกถนอมอาหาร (sealed box) ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค (foil bag) และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด polyamide ผสมกับ low density polyethylene (PA/LDPE) ภายใต้สภาวะสุญญากาศ (vacuum bag) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (5°C) และที่อุณหภูมิห้อง (30±5°C) เป็นเวลา 12 เดือน โดยความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ในตู้เย็นที่ใช้เก็บรักษาตัวอย่างตลอดระยะเวลา 12 เดือน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 85.73% ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้ในห้องที่ใช้เก็บรักษาตัวอย่างตลอดระยะเวลา 12 เดือน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 68.02% แสดงผลการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพที่เกิดขึ้นในดอกเห็ด ดังนี้

1. **การดูดซับความชื้น** (moisture absorption) **ของเห็ดอบแห้ง**

จากการวัดค่าการดูดกลับความชื้นของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 เดือน โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) จากน้ำหนักของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการเก็บรักษา พบว่า การดูดกลับความชื้นของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษา (ภาพ 33) โดยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในถุงฟอยด์แบบซิปล็อคทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลับความชื้นน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าดูดกลับความชื้นเท่ากับ 10.22% รองลงมาคือกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าดูดกลับความชื้นท่ากับ 12.83% และ 13.81% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่าดูดกลับความชื้นมีค่าดูดกลับความชื้นสูงสุดเท่ากับ 18.00% (ตาราง 26)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 12 เดือน พบว่า การดูดกลับความชื้นของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บรักษาเช่นเดียวกัน (ภาพ 33) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และในถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลับความชื้นน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าการดูดกลับความชื้นคิดเป็น 10.20% และ 10.46% ตามลำดับ ส่วนฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าการดูดกลับความชื้นคิดเป็น 11.62% ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่าการดูดกลับความชื้นคิดเป็น 15.44% (ตาราง 23)



ภาพ 33 อิทธิผลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกัน ต่อการเปลี่ยนแปลงการดูดซับความชื้น (moisture absorption)

ตาราง 23 อิทธิผลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงการดูดซับความชื้น (moisture absorption)

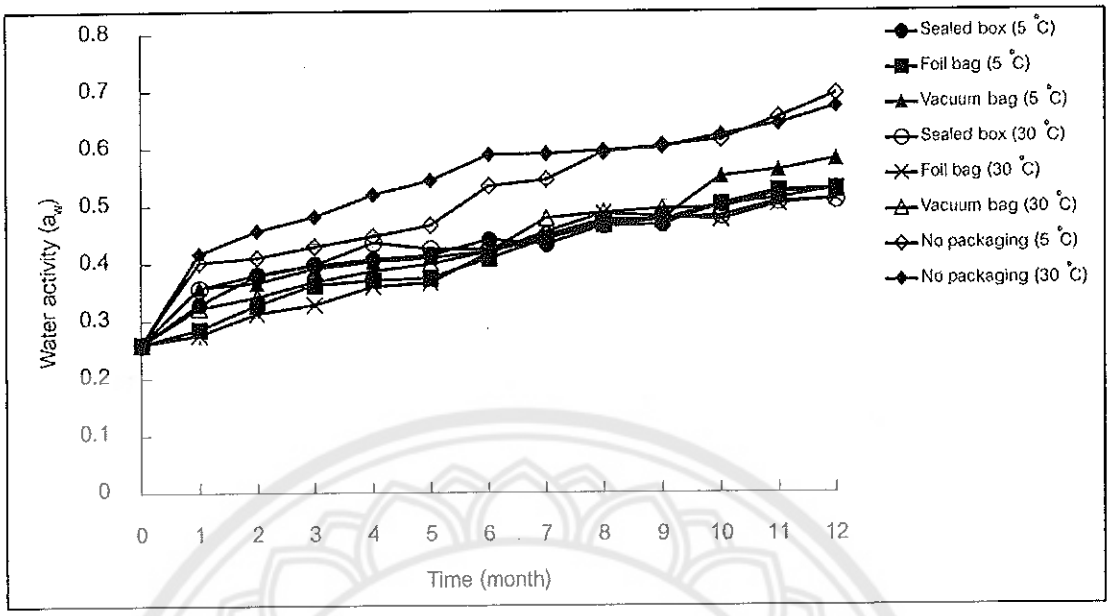
Packaging method	Moisture absorption (%) after 12 mo of storage
Sealed box at 5°C	12.83 ^{e}± 0.41
Foil bag at 5°C	10.22 ^{f}± 0.09
Vacuum bag 5°C	13.81 ^{c}± 0.16
Sealed box at 30°C	10.46 ^{f}± 0.18
Foil bag at 30°C	10.20 ^{f}± 0.18
Vacuum bag 30°C	11.62 ^{e}± 0.21
Control 1 (No packaging at 5°C)	18.00 ^{a}±0.40
Control 2 (No packaging at 30°C)	15.44 ^{b}± 0.13

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2. การเปลี่ยนแปลงค่า Water activity (a_w)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า Water activity (a_w) ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 24 จากตาราง พบว่า ค่า a_w ของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษาดังภาพ 34 โดยค่า a_w ของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเท่ากับ 0.26 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อคมีค่า a_w เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.53 เท่ากัน (เพิ่มขึ้นประมาณ 103.84% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนตัวอย่างที่เก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศมีค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.58 (เพิ่มขึ้นประมาณ 123.07% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.69 (เพิ่มขึ้นประมาณ 165.38% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ค่า a_w ของตัวอย่างเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาเช่นเดียวกันดังภาพ 34 โดยการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า a_w มีการเปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า a_w ที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.51 เท่ากัน (เพิ่มขึ้นประมาณ 91.15% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา ตามลำดับ) ส่วนถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.52 (เพิ่มขึ้นประมาณ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา ตามลำดับ) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่า a_w เท่ากับ 0.67 (เพิ่มขึ้นประมาณ 157.69% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



ภาพ 34 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกัน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w) ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

ตาราง 24 อิทธิผลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w)

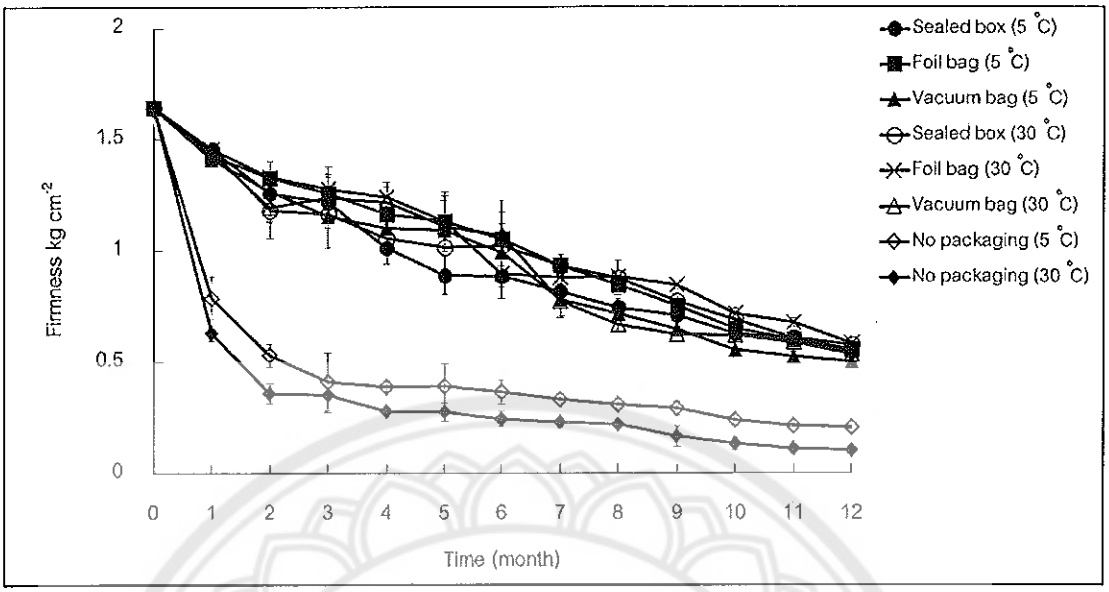
Packaging method	A_w		Percentage of increase (%)
	Before storage	After 12 mo of storage	
Sealed box at 5°C	0.26	0.53 ^{d}± 0.001	103.84
Foil bag at 5°C		0.53 ^{d}± 0.001	103.84
Vacuum bag 5°C		0.58 ^{c}± 0.001	123.07
Sealed box at 30°C		0.51 ^{e}± 0.001	96.15
Foil bag at 30°C		0.51 ^{e}±0.001	96.15
Vacuum bag 30°C		0.52 ^{d}± 0.002	100
Control 1 (No packaging at 5°C)		0.69 ^{a}± 0.002	165.38
Control 2 (No packaging at 30°C)		0.67 ^{b}±0.001	157.69

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

3. การเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อ (firmness)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 25 จากตาราง พบว่า ค่าความแน่นเนื้อของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา ดังภาพ 35 โดยค่าความแน่นเนื้อตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเท่ากับ 1.64 N เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่าความแน่นเนื้อเปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่าความแน่นเนื้อที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.54, 0.56 และ 0.50 N ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 67.07%, 65.85% และ 69.51% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.20 N (ลดลงประมาณ 87.80% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C ดังภาพ 35 โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่าความแน่นเนื้อที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.57, 0.58 และ 0.53 N (ลดลงประมาณ 65.24%, 64.63% และ 67.68% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.10 N (ลดลงประมาณ 93.90% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



ภาพ 35 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อ (firmness) ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

ตาราง 25 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณความแน่นเนื้อ (firmness)

Packaging method	Firmness (kg cm^{-2})		Percentage of decrease (%)
	Before storage	After 12 mo of storage	
Sealed box at 5°C	1.64	0.54 ^{ab}± .025	67.07
Foil bag at 5°C		0.56 ^{ab}± 0.030	65.85
Vacuum bag 5°C		0.50 ^{b}± 0.013	69.51
Sealed box at 30°C		0.57 ^{a}± 0.025	64.63
Foil bag at 30°C		0.58 ^{a}± 0.007	64.63
Vacuum bag 30°C		0.53 ^{ab}± 0.041	67.68
Control 1 (No packaging at 5°C)		0.20 ^{c}± 0.005	87.80
Control 2 (No packaging at 30°C)		0.10 ^{d}± 0.008	93.90

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

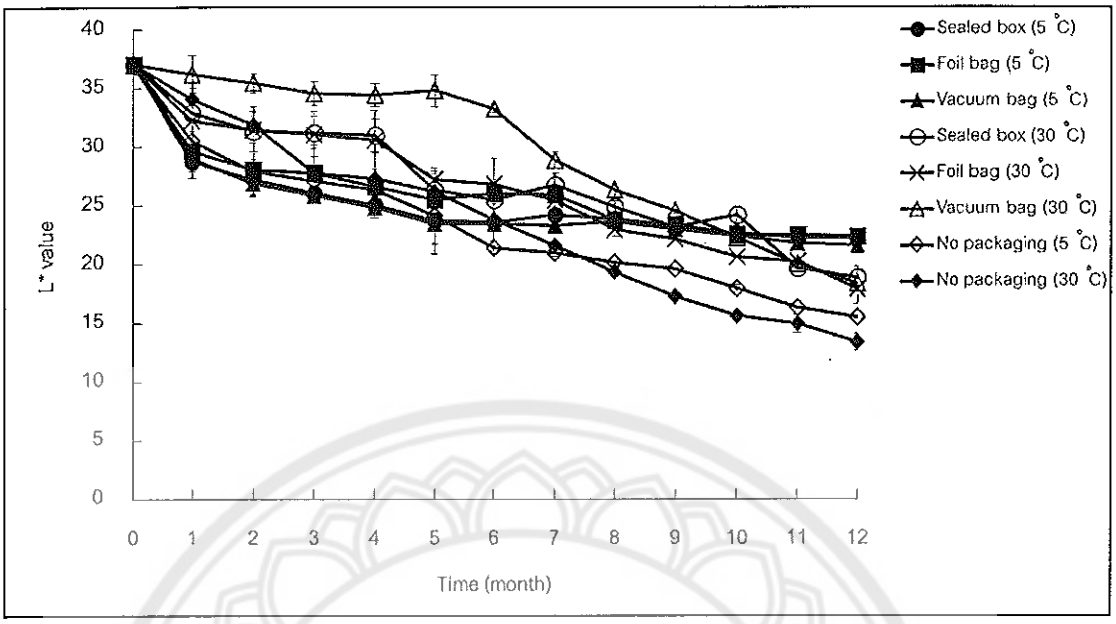
4. การเปลี่ยนแปลงสี (color) ของดอกเห็ด

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสีของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ได้รายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) ค่าสีเหลือง (b*) และเฉดสี (Hue angle; H°) ให้ผลการทดลองดังนี้

4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L*)

สำหรับค่าความสว่าง (L*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 37.03 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 26 จากตาราง พบว่า ค่า L* ของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 36) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า L* เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า L* ที่วัดได้ เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.20, 22.38 และ 21.61 ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 40.04%, 39.56% และ 41.64% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) ให้ค่า L* เฉลี่ยเท่ากับ 15.47 (ลดลงประมาณ 58.22% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C คือ ค่า L* มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 36) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า L* เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า L* ที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่า L* เฉลี่ยเท่ากับ 18.86, 17.89 และ 18.36 ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 49.48%, 51.68% และ 50.41% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) ให้ค่า L* เฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 13.38 (ลดลงประมาณ 63.86% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



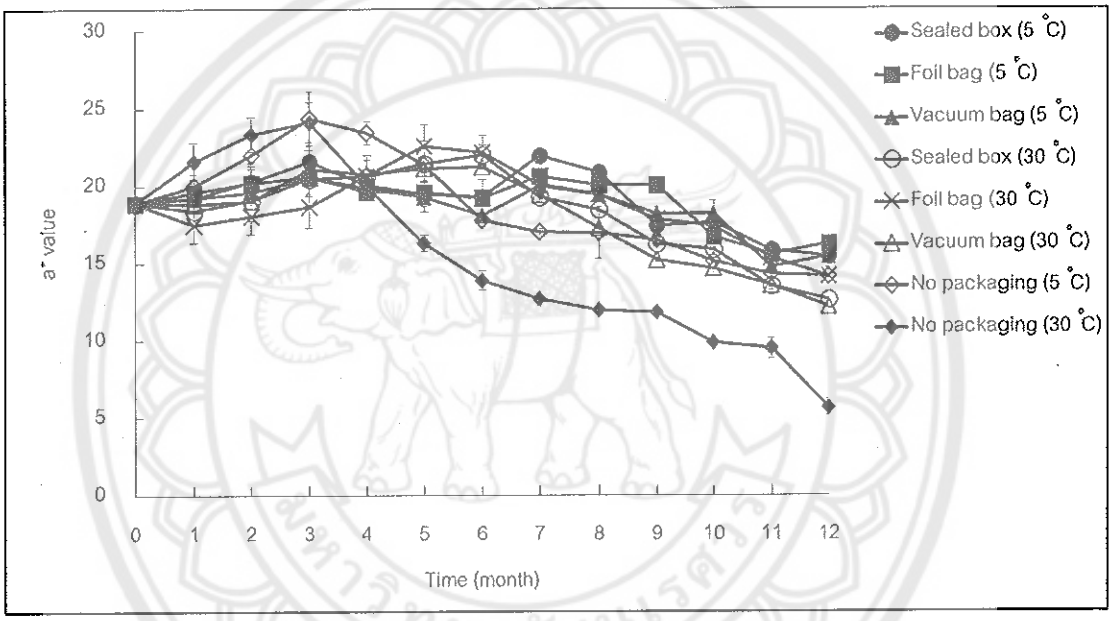
ภาพ 36 อิทธิพลการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*)

สำหรับค่าสีแดง (a*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18.90 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 26 จากตารางพบว่า ค่า a* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3 เดือนแรก หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 37) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ ทำให้ค่า a* เปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 15.45 และ 15.43 (ลดลงประมาณ 18.25% และ 18.35% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ให้ค่า a* เฉลี่ยเท่ากับ 16.24 (ลดลงประมาณ 14.07% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) ให้ค่า a* เฉลี่ยเท่ากับ 14.13 (ลดลงประมาณ 25.23% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C คือ ค่า a* มีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วง 3 เดือนแรก หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 37) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ทำให้ค่า a* เปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.17 (ลดลงประมาณ 25.02% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) รองลงมาคือการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ โดยให้ค่า a* เฉลี่ยเท่ากับ 12.64 และ 12.21 ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 33.12% และ 35.39% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) ให้ค่า a* เฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ 5.66 (ลดลงประมาณ 70.05% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



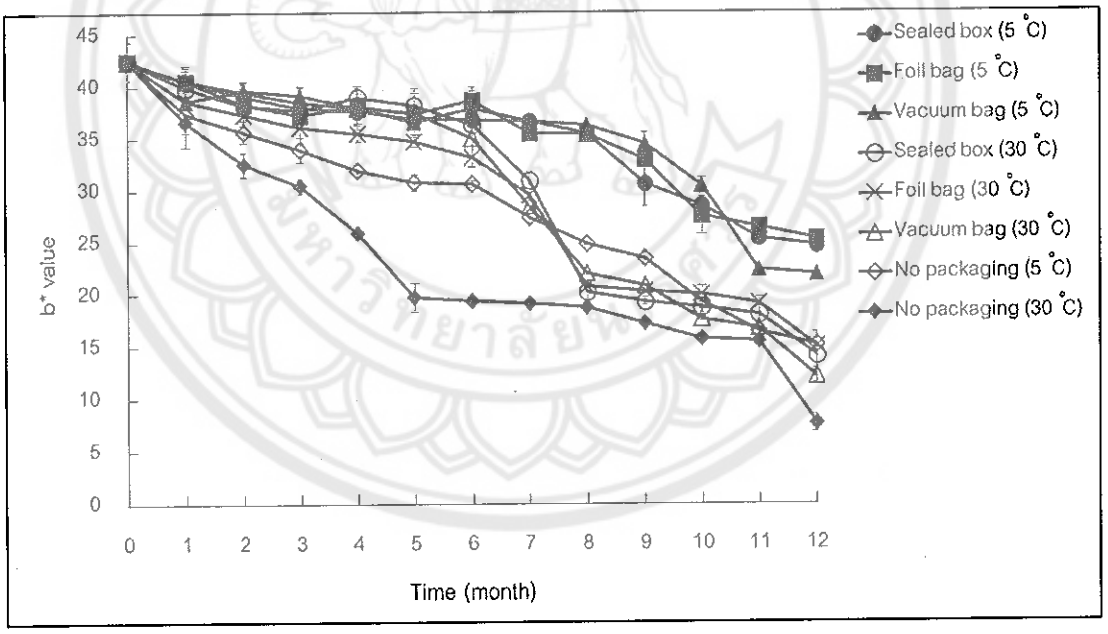
ภาพ 37 อิทธิพลการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b*)

สำหรับค่าสีเหลือง (b*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.55 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 27 จากตารางพบว่า ค่า b* มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 38) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ทำให้ค่า b* เปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.73 และ 25.29 ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 41.88% และ 40.56% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนการเก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ ให้ค่า b*

เฉลี่ยเท่ากับ 21.91 (ลดลงประมาณ 48.50% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) ให้ค่า a* เฉลี่ยเท่ากับ 15.15 (ลดลงประมาณ 64.39% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C คือ ค่า b* มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 38) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในกล่องพลาสติกฝนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ทำให้ค่า b* เปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.15 และ 15.0 (ลดลงประมาณ 66.74% และ 64.74 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนการเก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ ให้ค่า b* เฉลี่ยเท่ากับ 12.14 (ลดลงประมาณ 71.46% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) ให้ค่า b* เฉลี่ยเท่ากับ 7.62 (ลดลงประมาณ 82.09% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

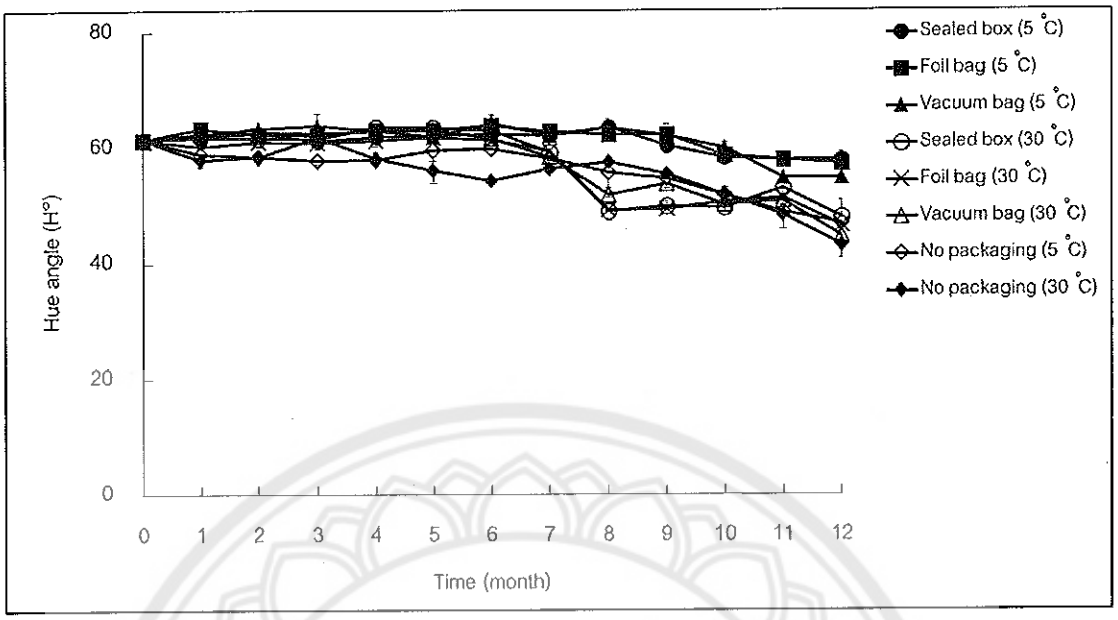


ภาพ 38 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (b*) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

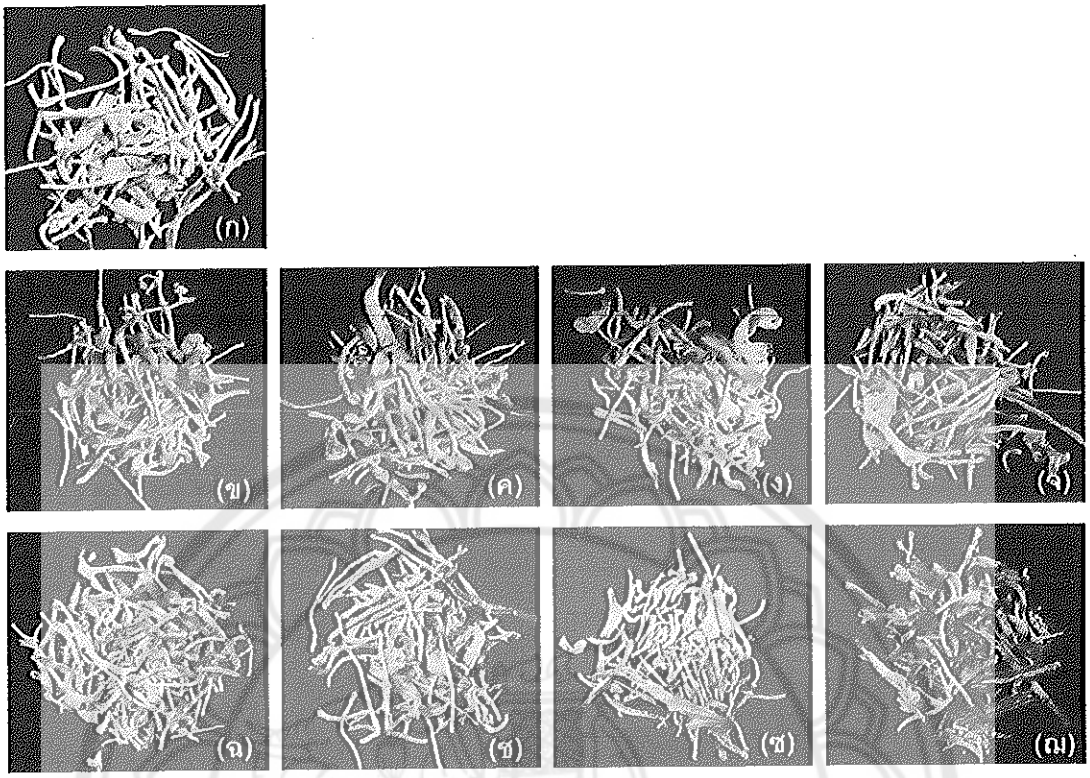
4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า Hue angle (H°)

ค่า Hue angle (H°) เป็นตัวเลขที่ระบุตำแหน่งของสีในกราฟ มีหน่วยเป็นองศา (°) ถ้า Hue = 0° แสดงว่า เป็นสีแดง และถ้า Hue = 90° แสดงว่า เป็นสีเหลือง ในการวัดค่า H° ของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษา พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 61.40° ดังนั้นจึงมีเฉดสีอยู่ระหว่างสีเหลืองกับสีแดง โดยเมื่อมองด้วยตาเปล่าจะมีสีเหลืองเข้ม เมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 27 จากตาราง พบว่า พบว่า ค่า H° มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 39) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า H° เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า H° ที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 57.99°, 57.27° และ 54.84° ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 5.55%, 6.72% และ 10.68% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะทำให้เฉดสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองเปลี่ยนไปจากเดิมเล็กน้อยโดยมีสีเข้มมากขึ้น ดังภาพ 40 (ก-ง) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่า H° เฉลี่ย 46.99° (ลดลงประมาณ 23.46% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ดังตาราง 27 ซึ่งทำให้ลักษณะเฉดสีของตัวอย่างมีสีเข้มขึ้นมากกว่าตัวอย่างเห็ดที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ดังภาพ 40 (จ)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C แต่มีแนวโน้มลดลงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C (ภาพ 39) โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า H° เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า H° ที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 47.98°, 46.64° และ 44.80° (ลดลงประมาณ 21.85%, 24.06 และ 27.03% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ดังตาราง 27 ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะทำให้เฉดสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสีเข้มมากขึ้น ดังภาพ 40 (ฉ-ช) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่า H° เท่ากับ 43.25° (ลดลงประมาณ 29.56% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งทำให้ลักษณะเฉดสีของตัวอย่างมีสีเข้มมากกว่าสภาวะการทดลองอื่นๆ โดยเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า เห็ดมีสีคล้ำเป็นจุดๆ ที่ผิวดอก ดังภาพ 40 (ฌ)



ภาพ 39 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกัน ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฉดสี (Hue angle; H°) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง



ภาพ 40 ลักษณะสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่ผ่านการเก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างเป็นระยะเวลา 12 เดือน

หมายเหตุ: (ก) เห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษา

(ข) เก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหารที่อุณหภูมิ 5°C

(ค) เก็บรักษาในถุงฟอยด์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 5°C

(ง) เก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 5°C

(จ) ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 5°C

(ฉ) เก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหารที่อุณหภูมิ 30°C

(ช) เก็บรักษาในถุงฟอยด์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 30°C

(ซ) เก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 30°C

(ฌ) ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C

ตาราง 26 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงสีค่าความสว่าง (L*) และค่าสีแดง (a*)

Packaging method	L*			a*		
	Before storage	After 12 mo of storage	Percentage of decrease (%)	Before storage	After 12 mo of storage	Percentage of decrease (%)
Sealed box at 5°C	37.03	22.20 ^{a}± 0.06	40.04	18.90	15.45 ^{b}± 0.43	18.25
Foil bag at 5°C		22.38 ^{a}± 0.25	39.56		16.24 ^{a}± 0.10	14.07
Vacuum bag 5°C		21.61 ^{a}± 0.22	41.64		15.43 ^{b}± 0.25	18.35
Sealed box at 30°C		18.86 ^{b}± 0.93	49.06		12.64 ^{d}± 0.39	33.12
Foil bag at 30°C		17.89 ^{b}± 1.24	51.68		14.17 ^{c}± 0.53	25.02
Vacuum bag 30°C		18.36 ^{b}± 0.07	50.41		12.21 ^{d}± 0.16	35.39
Control 1 (No packaging at 5°C)		15.47 ^{c}± 0.07	58.22		14.13 ^{c}± 0.38	25.23
Control 2 (No packaging at 30°C)		13.38 ^{d}± 0.69	63.86		5.66 ^{e}± 0.50	70.05

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ตาราง 27 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าสีเหลือง (b*) และ Hue angle (H°)

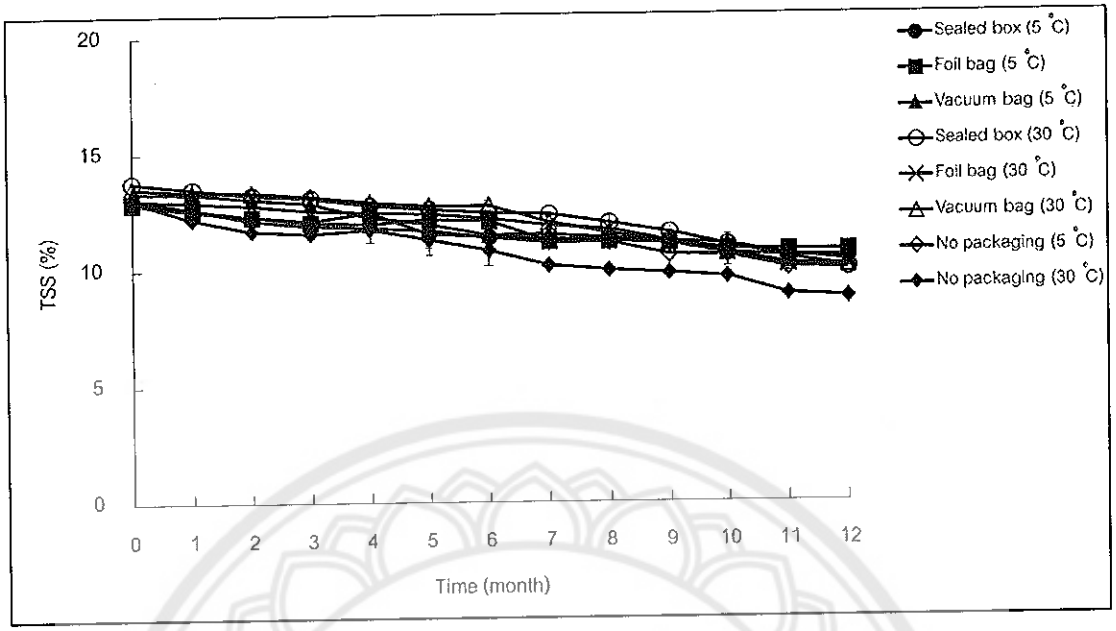
Packaging method	b*			H°		
	Before storage	After 12 mo of storage	Percentage of decrease (%)	Before storage	After 12 mo of storage	Percentage of decrease (%)
Sealed box at 5°C	42.55	24.73 ^{a} ± 0.56	41.88	61.40	57.99 ^{a} ± 1.30	5.55
Foil bag at 5°C		25.29 ^{a} ± 0.50	40.56		57.27 ^{a} ± 0.47	6.72
Vacuum bag 5°C		21.91 ^{b} ± 0.17	48.50		54.84 ^{a} ± 0.50	10.68
Sealed box at 30°C		14.15 ^{c} ± 2.17	66.74		47.98 ^{b} ± 4.89	21.85
Foil bag at 30°C		15.00 ^{c} ± 0.57	64.74		46.64 ^{b} ± 0.78	24.03
Vacuum bag 30°C		12.14 ^{d} ± 0.69	71.46		44.80 ^{b} ± 2.03	27.03
Control 1 (No packaging at 5°C)		15.15 ^{c} ± 0.28	64.39		46.99 ^{b} ± 1.14	23.46
Control 2 (No packaging at 30°C)		7.62 ^{e} ± 0.80	82.09		43.25 ^{b} ± 5.42	29.56

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

5. การเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 28 จากตารางพบว่า ค่า TSS ของตัวอย่างทุกสภาวะทดลองมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 41) โดยค่า TSS ของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.03% เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า TSS เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า TSS ที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.50, 10.76, 10.33 ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 19.41%, 17.42% และ 20.72% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่า TSS เฉลี่ยเท่ากับ 9.96% (ลดลงประมาณ 23.56% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C (ภาพ 41) การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ค่า TSS เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยค่า TSS ที่วัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.0%,10.06% และ 10.13% (ลดลงประมาณ 23.25%, 22.79% และ 22.25% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่าTSS เท่ากับ 8.73% (ลดลงประมาณ 33% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



ภาพ 41 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble solid; TSS)

ตาราง 28 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS)

Packaging method	Total soluble solid (TSS) (%)		Percentage of decrease (%)
	Before storage	After 12 mo of storage	
Sealed box at 5°C	13.03	10.50 ^{ab}± 0.52	19.41
Foil bag at 5°C		10.76 ^{a}± 0.11	17.42
Vacuum bag 5°C		10.33 ^{abc}± 0.30	20.72
Sealed box at 30°C		10.00 ^{c}± 0.20	23.25
Foil bag at 30°C		10.06 ^{bc}±0.15	22.79
Vacuum bag 30°C		10.13 ^{bc}± 0.0.5	22.25
Control 1 (No packaging at 5°C)		9.96 ^{c}± 0.15	23.56
Control 2 (No packaging at 30°C)		8.73 ^{d}± 0.15	33.00

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

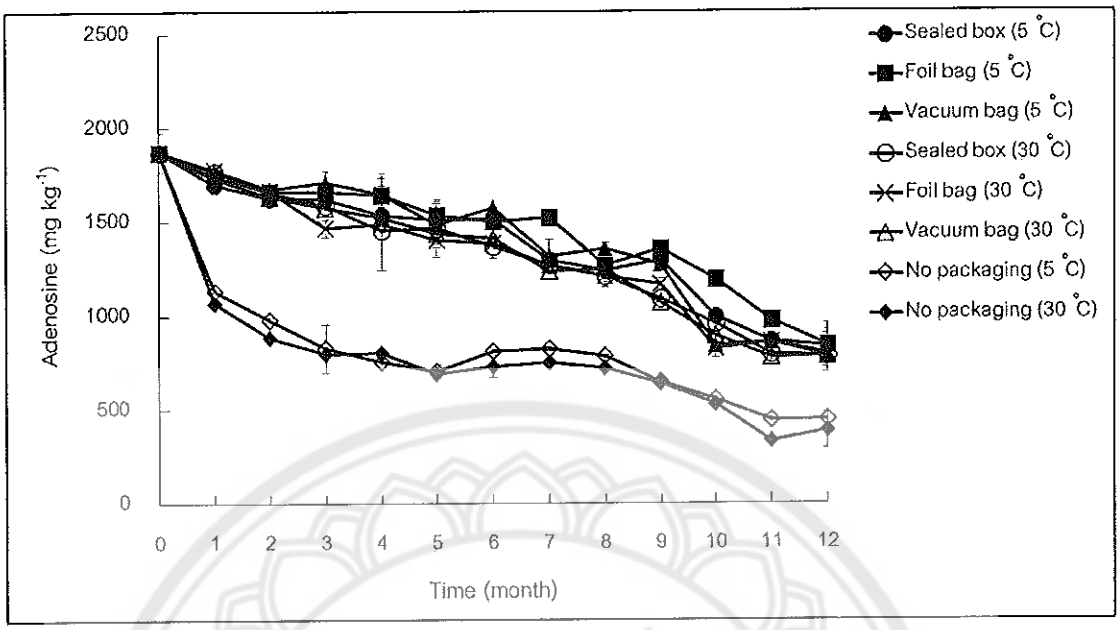
6. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ได้วิเคราะห์ปริมาณสาร 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ให้ผลการทดลองดังนี้

6.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีน

สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,873.08 mg kg^{-1} เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 29 จากตารางพบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีน มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 42) โดยการเก็บรักษาบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีปริมาณสารอะดีโนซีนคงเหลือเฉลี่ยเท่ากับ 836.59, 843.46 และ 787.38 mg kg^{-1} ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 55.33%, 54.96% และ 57.96% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีค่าสารอะดีโนซีนคงเหลือเฉลี่ย 445.79 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 76.20% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่ 5°C คือ ปริมาณสารอะดีโนซีนมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 42) โดยการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนเปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยปริมาณสารอะดีโนซีนคงเหลือที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 786.25, 801.32 และ 784.48 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 58.02%, 57.21 และ 58.11% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีค่าสารอะดีโนซีนคงเหลือต่ำที่สุดเฉลี่ย 386.76 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 79.35% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

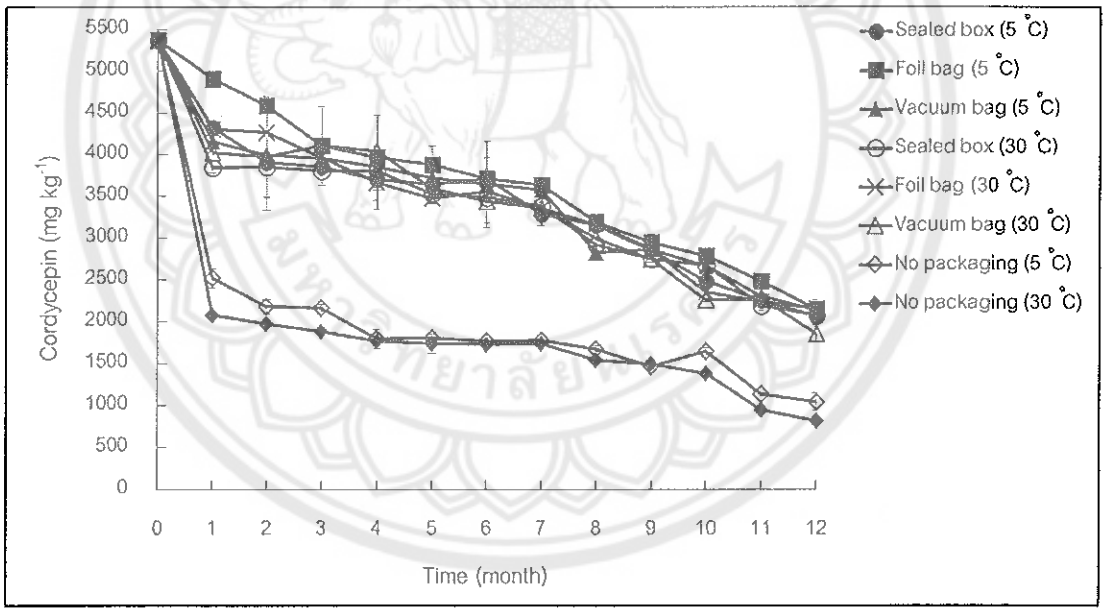


ภาพ 42 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีน (adenosine) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

6.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคอร์ไดเซปิน

สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5,373.66 mg kg^{-1} เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C พบว่า นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 29 จากตารางพบว่า ปริมาณสารคอร์ไดเซปินมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 43) โดยการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินเปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยปริมาณสารคอร์ไดเซปินคงเหลือที่วัดได้เมื่อเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2,064.53, 2,150.02 และ 2,136.96 mg kg^{-1} ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 61.58%, 59.98% และ 60.23% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินคงเหลือเฉลี่ย 1,044.78 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 79.44% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บรักษาที่ 5°C คือ ปริมาณสารคอร์ไดเซปินมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 43) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อค ทำให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2,082.58 และ 2,157.74 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 61.24% และ 59.84% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ส่วนการเก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินคงเหลือเฉลี่ย 1,854.56 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 65.48% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินคงเหลือต่ำที่สุดเฉลี่ย 812.59 mg kg^{-1} (ลดลงประมาณ 84.87% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา)



ภาพ 43 อิทธพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

ตาราง 29 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin)

Packaging method	Adenosine concentration (mg kg^{-1})		Percentage of decrease (%)	Cordycepin concentration (mg kg^{-1})		Percentage of decrease (%)
	Before storage	After 12 mo of storage		Before storage	After 12 mo of storage	
Sealed box at 5°C	1, 873.08	836.59 ^{a}± 90.21	55.33	5,373.66	2,064.53 ^{ab}± 104.29	61.58
Foil bag at 5°C		843.46 ^{a}± 116.93	54.96		2,150.02 ^{a}± 116.92	59.98
Vacuum bag 5°C		787.38 ^{a}± 10.81	57.96		2,136.96 ^{ab}± 124.09	60.23
Sealed box at 30°C		786.25 ^{a}± 16.21	58.02		2,082.58 ^{ab}± 119.94	61.24
Foil bag at 30°C		801.32 ^{a}± 104.44	57.21		2,157.74 ^{a}± 107.59	59.84
Vacuum bag 30°C		784.48 ^{a}± 16.56	58.11		1,854.56 ^{b}± 84.33	65.48
Control 1 (No packaging at 5°C)		445.79 ^{b}± 21.13	76.20		1,044.78 ^{c}± 101.36	80.55
Control 2 (No packaging at 30°C		386.76 ^{b}± 96.62	79.35		812.59 ^{d}± 48.47	84.87

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

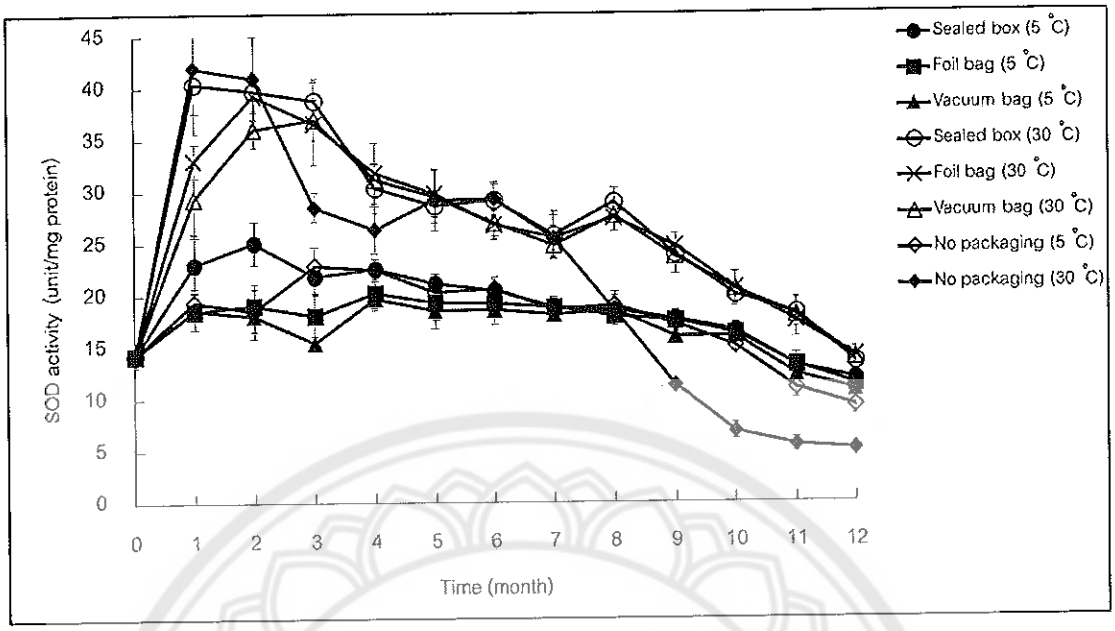
7. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์คะตาเลส (catalase; CAT) และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POX) ให้ผลการทดลองดังนี้

7.1 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD activity)

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.29 ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม (unit/mg protein) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 30 จากตารางพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 2 เดือนแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 44) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในเดือนที่ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.05 unit/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเท่ากับ 11.88 unit/mg protein (ลดลง 16.86% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) สำหรับการเก็บรักษาในถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในช่วงเดือนที่ 4 เท่ากับ 20.22 และ 19.71 unit/mg protein ตามลำดับ หลังจากนั้นจะลดลง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเท่ากับ 11.35 และ 10.77 unit/mg protein ตามลำดับ (ลดลง 20.57% และ 24.63% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในเดือนสุดท้ายของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในช่วงเดือนที่ 3 เท่ากับ 22.80 unit/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเท่ากับ 9.28 unit/mg protein (ลดลง 35.05% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุทั้ง 3 ชนิด

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะคล้ายกันกับการเก็บที่อุณหภูมิ 5°C (ภาพ 44) แต่มีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในเดือนที่ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 40.43 unit/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเท่ากับ 13.53 unit/mg protein (ลดลง 5.31% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) สำหรับการเก็บรักษาในถุงฟอยด์แบบซิปล็อค กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในเดือนที่ 2 เท่ากับ 39.25 unit/mg protein ตามลำดับ หลังจากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD เท่ากับ 14.01 unit/mg protein (ลดลง 1.95% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่การเก็บรักษาในถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในเดือนที่ 3 มีค่าเท่ากับ 36.98 unit/mg protein หลังจากนั้นจะลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเท่ากับ 13.87 unit/mg protein (เพิ่มขึ้น 2.93% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในเดือนสุดท้ายของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงสุดในเดือนแรก โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 41.98 unit/mg protein หลังจากนั้นมีค่าลดลงและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยก่อนจะลดลงอีกครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD เท่ากับ 5.12 unit/mg protein (ลดลง 64.17% เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุทั้ง 3 ชนิด



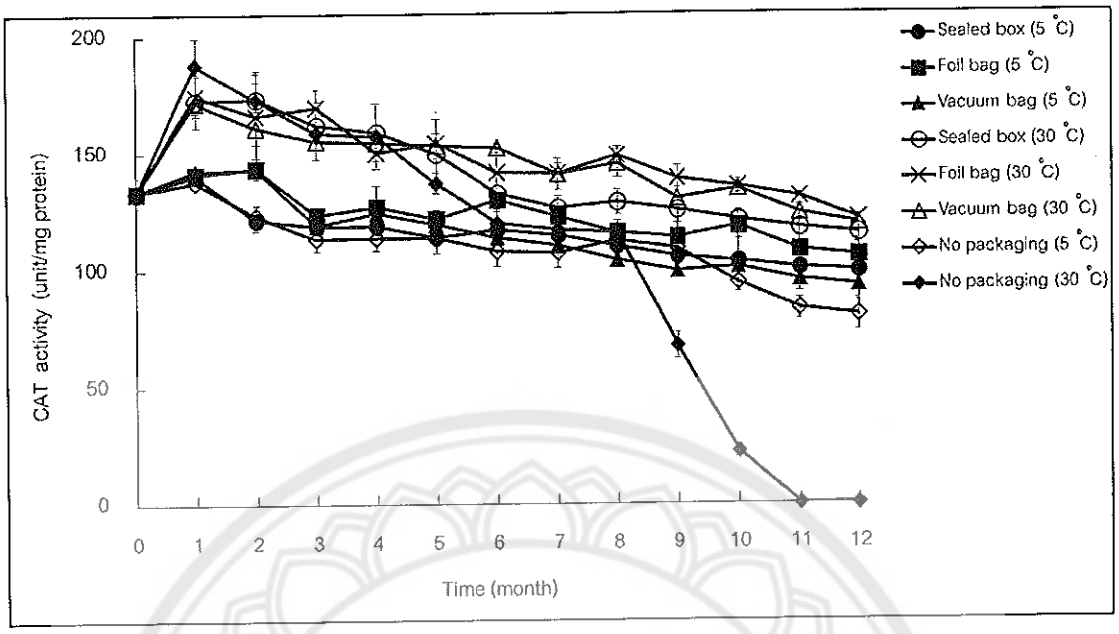
ภาพ 44 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD activity)

7.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT activity)

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งก่อนการเก็บรักษามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 133.58 ยูนิต/นาที/โปรตีน 1 มิลลิกรัม (unit/min/mg protein) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C นาน 12 เดือน ผลการศึกษาดังตาราง 30 จากตารางพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเดือนแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา (ภาพ 45) โดยตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกแบบสุญญากาศ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงสุดในเดือนแรก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 140.60, 141.47, และ 142.62 unit/min/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของตัวอย่างที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.50, 105.95 และ 93.35 unit/min/mg protein ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 20.68%, 25.51% และ 30.11% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 5°C) (control 1) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าสูงสุดในเดือนแรก

โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 138.04 unit/min/mg protein หลังจากนั้นมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80.50 unit/min/mg protein (ลดลงประมาณ 39.73% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในภาชนะบรรจุทั้ง 3 ชนิด

เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 12 เดือน พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเก็บที่อุณหภูมิ 5°C (ภาพ 45) โดยตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกแบบสุญญากาศ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT สูงสุดในเดือนแรก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 172.92, 174.92, และ 171.82 unit/min/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของตัวอย่างที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 115.58, 121.78 และ 119.86 unit/min/mg protein ตามลำดับ (ลดลงประมาณ 13.47%, 8.83% และ 10.27% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ก่อนการเก็บรักษา) ดังตาราง 30 ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ (no packaging at 30°C) (control 2) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าสูงสุดในเดือนแรก โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 187.97 unit/min/mg protein หลังจากนั้นมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงเดือนที่ 8 หลังจากนั้น พบว่า มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในเดือนที่ 11 เป็นต้นไป



ภาพ 45 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT activity)

7.3 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase (POX)

จากการทดลองไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในทุกสภาวะการทดลอง

ตาราง 30 อิทธิพลของการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในสภาวะที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD activity) และเอนไซม์ catalase (CAT activity)

Packaging method	SOD activity (unit/mg protein)		Percentage of decrease (%)	CAT activity (unit/min/mg protein)		Percentage of decrease (%)
	Before storage	After 12 mo of storage		Before storage	After 12 mo of storage	
Sealed box at 5°C	14.29	11.88 ^{bc}± 0.53	16.86	133.58	99.50 ^{bc}± 13.09	25.51
Foil bag at 5°C		11.35 ^{c}± 0.89	20.57		105.95 ^{abc}± 4.96	20.68
Vacuum bag 5°C		10.77 ^{cd}± 0.48	24.63		93.35 ^{cd}± 3.07	30.11
Sealed box at 30°C		13.53 ^{ab}± 0.28	5.31		115.58 ^{ab}± 4.24	13.47
Foil bag at 30°C		14.01 ^{a}± 0.80	1.95		121.78 ^{a}± 1.12	8.83
Vacuum bag 30°C		13.87 ^{a}± 0.39	2.93		119.86 ^{a}± 1.87	10.27
Control 1 (No packaging at 5°C)		9.28 ^{d}± 0.90	35.05		80.50 ^{d}± 6.73	39.73
Control 2 (No packaging at 30°C)		5.12 ^{e}± 0.04	64.17		NF	-

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

NF = not found

ผลการทดลองที่ 4 การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์ด้านผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการศึกษาทดลองเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน 8 วิธี ได้แก่ 1) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, 2) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, 3) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, 4) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C, 5) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C, 6) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1, 7) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2 และ 8) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 จากนั้นทำการประเมินผลของการเก็บรักษาต่อการคงคุณภาพของสายพันธุ์ในด้านผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการศึกษามีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. อิทธิพลการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิต (viability) และความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อเห็ดถังเช่าสีทอง

หลังจากเก็บรักษาหัวเชื้อที่เป็นเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 8 วิธี เป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน แล้วนำเส้นใยมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ (potato dextrose agar, PDA) เพื่อทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อ (viability) โดยประเมินจากจำนวนจานเพาะเลี้ยงที่มีการเจริญเติบโตของเส้นใย (plate number of mycelia growth) ระยะเวลาที่เส้นใยเริ่มเจริญบนอาหาร (mycelial growth recovery) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย (mycelial colony diameter) จากการทดลอง พบว่า เส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด 100% โดยเส้นใยมีการเจริญเติบโตในทุกจานอาหารเพาะเลี้ยง (ตาราง 31) ระยะเวลาที่เส้นใยเริ่มมีการเจริญ (mycelial growth recovery) พบว่าเส้นใยเริ่มเจริญขึ้นภายใน 1 วัน หลังจากถ่ายเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ยกเว้นในเทคนิคการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (freezing at -80°C) พบว่า ใช้ระยะเวลาประมาณ 2 วัน จึงเริ่มมีการเจริญของเส้นใย (ตาราง 31) เมื่อนำเส้นใยที่เก็บรักษาในแต่ละวิธีในช่วงเดือนที่ 4, 8 และ 12 มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน แล้วทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี พบว่า ขนาดของโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังภาพ 46

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีค่าอยู่ระหว่าง 34.6-56.6 มิลลิเมตร โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% (chilling in 10% (v/v) glycerol at 5°C) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 56.6 และ 55.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีของกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture) ก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 56.8 มิลลิเมตร ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 (chilling at 5°C in PDA 3rd subculture) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 34.6 มิลลิเมตร (ตาราง 31)

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 โดยโคโลนีของเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 37.6-56.2 มิลลิเมตร เส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 56.2 และ 55.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 56.8 มิลลิเมตร ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 37.6 มิลลิเมตร (ตาราง 31)

สำหรับในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 และเดือนที่ 8 โดยโคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 32.4-55.0 มิลลิเมตร โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมากที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 55.0 และ 54.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ และให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีของกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 56.8 มิลลิเมตร ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 32.4 มิลลิเมตร (ตาราง 31)

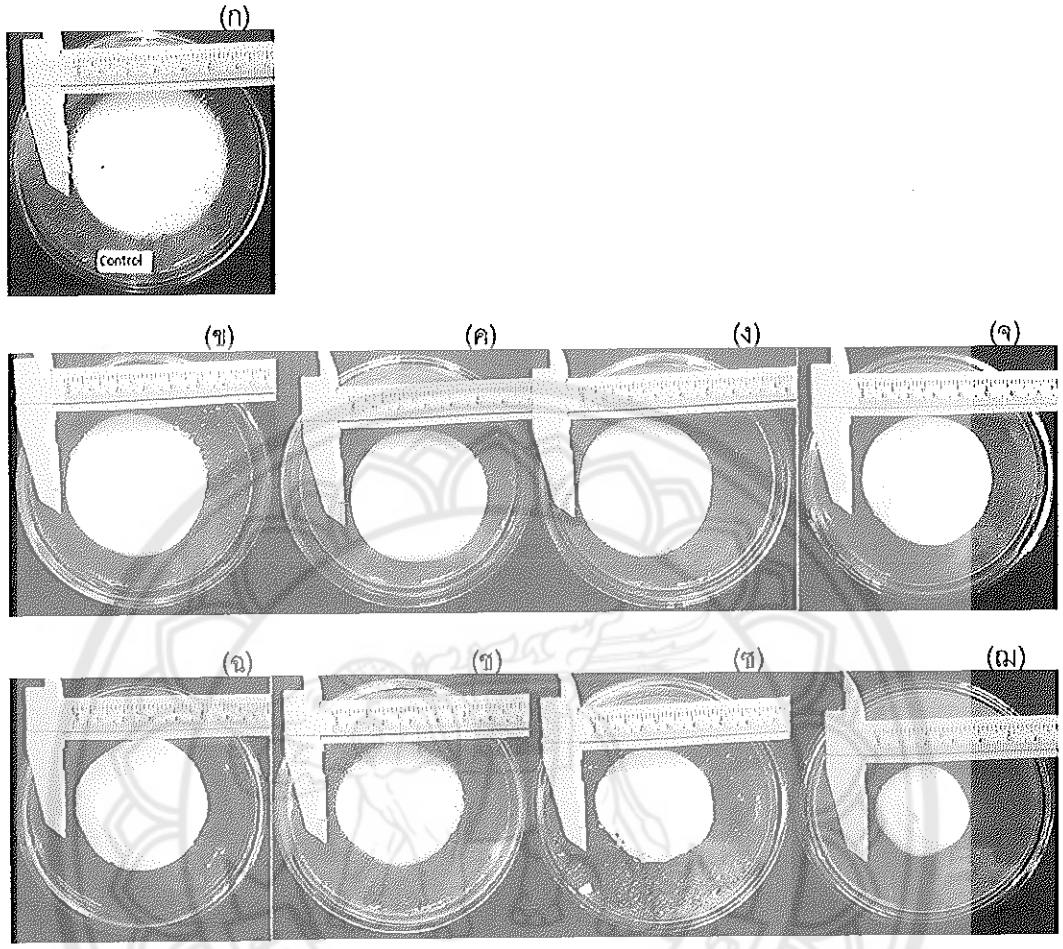
สำหรับการทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ (purity) พบว่า การเจริญเติบโตของเส้นใย มีลักษณะโคโลนีเป็นวงกลม สีขาวนวล และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ 100% ในทุกสภาวะการทดลอง ดังตาราง 31

ตาราง 31 การรอดชีวิต (viability) และความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน

Preservation method	Viability									Purity (%)		
	Plate no. of mycelia growth (n1 /n2)*			Mycelial growth recovery (day)			Mycelial colony diameter mean (mm) ± SD					
	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months
Before preservation (control)	5/5	5/5	5/5	1	1	1	56.8 ^{a} ± 0.8	56.8 ^{a} ± 0.8	56.8 ^{a} ± 0.8	100	100	100
Freezing at -80°C	5/5	5/5	5/5	2	2	2	56.6 ^{a} ± 1.6	56.2 ^{a} ± 0.8	55.0 ^{ab} ± 1.0	100	100	100
Chilling storage at 5°C in;												
10% (v/v) glycerol at 5°C	5/5	5/5	5/5	1	1	1	55.4 ^{a} ± 1.1	55.7 ^{a} ± 0.6	54.4 ^{b} ± 1.6	100	100	100
rice grains dried at 35°C	5/5	5/5	5/5	1	1	1	51.0 ^{b} ± 1.5	51.6 ^{b} ± 1.3	50.6 ^{c} ± 1.5	100	100	100
rice grains dried at 45°C	5/5	5/5	5/5	1	1	1	49.8 ^{b} ± 0.8	51.5 ^{b} ± 0.6	49.2 ^{c} ± 1.3	100	100	100
rice grains dried at 55°C	5/5	5/5	5/5	1	1	1	50.8 ^{b} ± 0.8	50.4 ^{b} ± 0.5	49.2 ^{c} ± 0.8	100	100	100
PDA 1st subculture	5/5	5/5	5/5	1	1	1	47.0 ^{c} ± 1.2	47.4 ^{c} ± 0.4	45.2 ^{d} ± 1.9	100	100	100
PDA 2nd subculture	5/5	5/5	5/5	1	1	1	40.0 ^{d} ± 1.5	44.9 ^{d} ± 1.7	35.2 ^{e} ± 2.2	100	100	100
PDA 3rd subculture	5/5	5/5	5/5	1	1	1	34.6 ^{e} ± 2.0	37.6 ^{e} ± 1.9	32.4 ^{f} ± 1.1	100	100	100

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

*n1: จำนวนซ้ำของจานอาหารเพาะเลี้ยง; n2: จำนวนของจานอาหารเพาะเลี้ยงที่เส้นใยมีการเจริญ, ถ้าเส้นใยเจริญครบทุกจานเพาะเลี้ยง คือ 5/5 แสดงว่ามีอัตราการรอดของเชื้อ 100%



ภาพ 46 ขนาดโคโลนีของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แต**กต่างกัน** เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน

หมายเหตุ: (ก) เส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture),
(ข) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ค) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ง) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C,
(จ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C,
(ฉ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C,
(ช) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1,
(ซ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2,
(ฌ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3

2. อิทธิพลการเก็บรักษาต่อการคงสภาพ (stability) ของเชื้อ

จากการทดสอบการคงสภาพของเชื้อ (stability) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกัน โดยทำการประเมินผลในด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ จำนวนดอก น้ำหนักสด ความแน่นเนื้อ ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) สีดอก ปริมาณสารอะดีโนซีน และสารคอร์ไดเซปิน ให้ผลการทดลองดังนี้

2.1 จำนวนดอก และน้ำหนักสด

จากการประเมินคุณภาพของเชื้อในด้านผลผลิตที่เป็นจำนวนดอกและน้ำหนักสด โดยนำเส้นใยที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันในเดือนที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในหารเหลว PDB และอาหารข้าวตามลำดับ เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด (stroma) เป็นระยะเวลา 60 วัน จากการทดลองพบว่า จำนวนดอก และน้ำหนักสดที่วัดค่าได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังตาราง 32 ดังนี้

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า จำนวนดอกเห็ดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 66.66-112.66 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณจำนวนดอกมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 112.66, 111.33, 110.33 และ 109.66 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 114.33 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ผลผลิตจำนวนดอกน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 66.66 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม

สำหรับน้ำหนักสดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 14.66-22.43 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณน้ำหนักสดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 22.43, 21.76, 21.86 และ 21.80 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 22.33 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่

เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้น้ำหนักสดน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 14.66 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม นอกจากนี้ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีลักษณะสั้นกว่าสภาวะทดลองอื่นๆ ดังภาพ 47

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า จำนวนดอกเห็ดให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 โดยจำนวนดอกเห็ดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 63.0-111.0 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณจำนวนดอกมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 111.0, 112.6, 108.3 และ 111.3 ดอกต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 114.33 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ผลผลิตจำนวนดอกน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 63.0 ดอกต่ออาหารเพาะ 50 กรัม

สำหรับน้ำหนักสดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 15.3-22.2 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณน้ำหนักสดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 22.2, 22.0, 21.7 และ 21.3 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 22.33 กรัมต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้น้ำหนักสดน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 15.3 กรัมต่ออาหารเพาะ 50 กรัม นอกจากนี้ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีลักษณะสั้นกว่าสภาวะทดลองอื่นๆ ดังภาพ 48

ในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า จำนวนดอกเห็ดให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 และเดือนที่ 8 จำนวนดอกเห็ดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 67.6-116.2 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็น

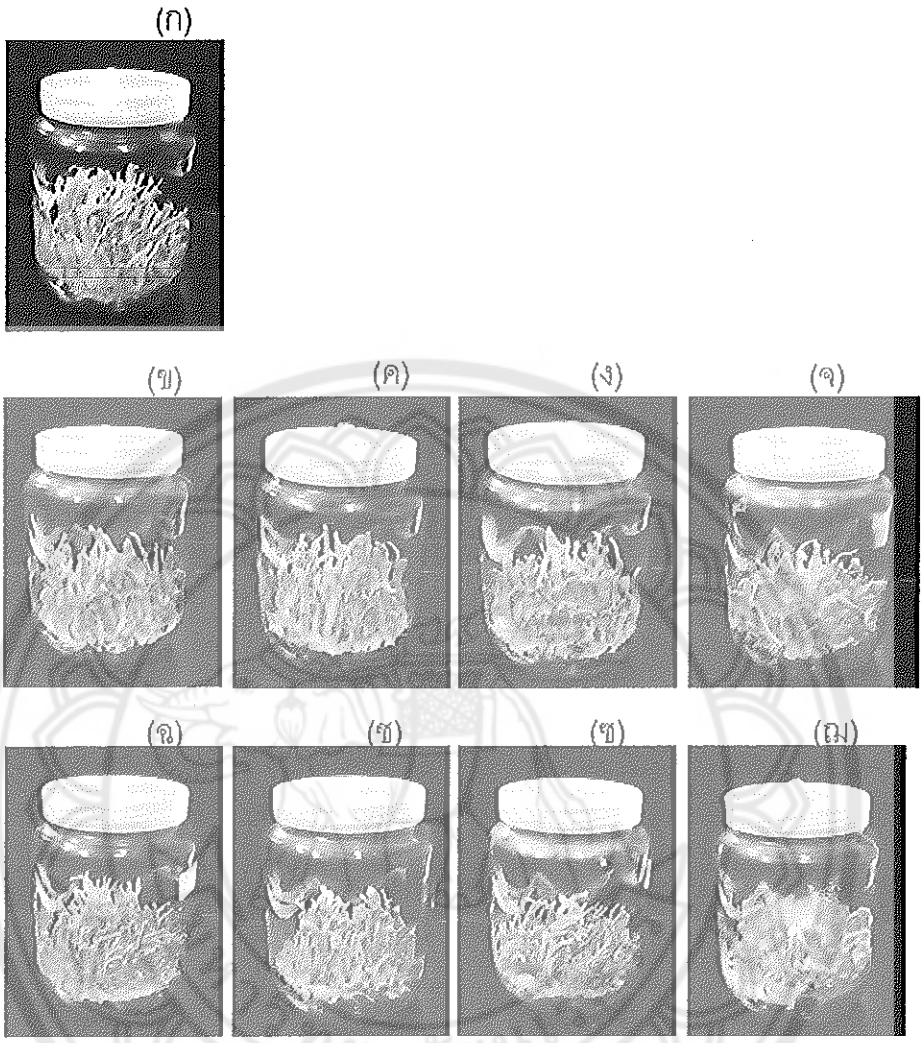
ที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณจำนวนดอกมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 116.2, 1136, 111.2, และ 110.6 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีจำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 114.33 ดอกต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ผลผลิตจำนวนดอกน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 67.6 ดอก ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม

สำหรับน้ำหนักสดมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 16.7-22.2 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C ให้ปริมาณน้ำหนักสดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 22.2, 22.3, 22.1 และ 21.8 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีน้ำหนักสดเฉลี่ยเท่ากับ 22.33 กรัมต่ออาหารเพาะ 50 กรัม ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้น้ำหนักสดน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 16.7 กรัม ต่ออาหารเพาะ 50 กรัม นอกจากนี้ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ยังมีลักษณะสั้นกว่าสภาวะทดลองอื่นๆ ดังภาพ 49

ตาราง 32 การคงสภาพ (stability) ด้านผลผลิตดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน

Preservation method	Stability					
	No. of fruiting bodies (fruit body/50 g of rice culture)			Fresh weight (g/50 g of rice culture)		
	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months
Before preservation *(control)*	114.3 ^{a} ± 1.5	114.3 ^{a} ± 1.5	114.3 ^{a} ± 1.5	22.3 ^{a} ± 0.4	22.3 ^{a} ± 0.4	22.3 ^{a} ± 0.4
Freezing at -80°C	112.6 ^{a} ± 1.5	111.0 ^{a} ± 4.5	116.2 ^{a} ± 2.1	22.4 ^{a} ± 0.8	22.2 ^{a} ± 0.7	22.2 ^{a} ± 0.6
Chilling storage at 5°C in;						
10% *(v/v)* glycerol at 5°C	111.3 ^{a} ± 2.0	112.6 ^{a} ± 2.5	113.6 ^{a} ± 1.1	21.7 ^{a} ± 0.8	22.0 ^{a} ± 0.9	22.3 ^{a} ± 0.8
rice grains dried at 35°C	110.3 ^{a} ± 1.5	108.3 ^{a} ± 8.6	111.2 ^{a} ± 7.9	21.8 ^{a} ± 0.5	21.7 ^{a} ± 1.3	22.1 ^{a} ± 0.4
rice grains dried at 45°C	109.6 ^{a} ± 1.5	111.3 ^{a} ± 9.6	110.6 ^{a} ± 5.0	21.8 ^{a} ± 0.2	21.3 ^{a} ± 1.1	21.8 ^{a} ± 1.6
rice grains dried at 55°C	103.0 ^{b} ± 4.5	94.0 ^{b} ± 6.2	89.8 ^{b} ± 5.0	19.6 ^{b} ± 0.9	19.2 ^{b} ± 1.4	19.8 ^{b} ± 0.9
PDA 1st subculture	99.3 ^{bc} ± 2.3	83.0 ^{c} ± 3.6	77.8 ^{c} ± 5.8	17.7 ^{bc} ± 0.9	18.6 ^{b} ± 0.4	18.7 ^{b} ± 1.2
PDA 2nd subculture	97.0 ^{c} ± 3.6	73.0 ^{cd} ± 6.2	85.3 ^{bc} ± 5.8	17.1 ^{c} ± 1.0	18.1 ^{b} ± 1.0	18.4 ^{bc} ± 1.3
PDA 3rd subculture	66.6 ^{d} ± 2.5	63.0 ^{d} ± 7.2	67.6 ^{d} ± 4.0	14.6 ^{d} ± 0.3	15.3 ^{c} ± 0.8	16.7 ^{c} ± 0.4

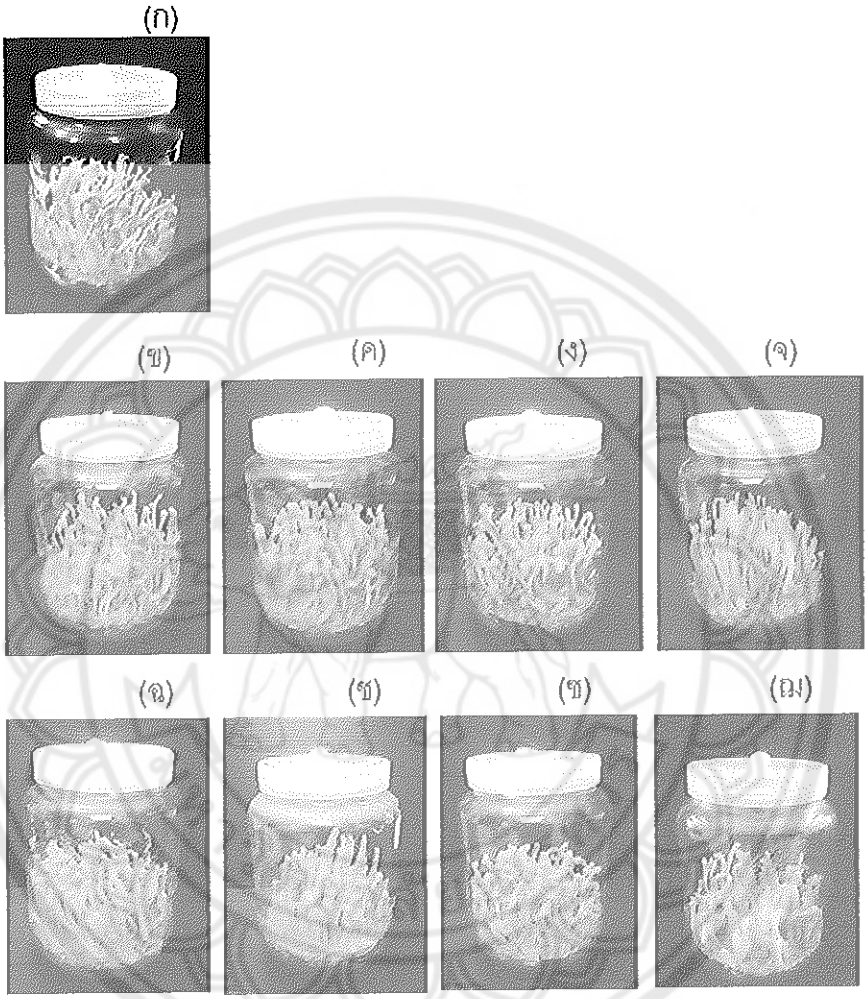
หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)



ภาพ 47 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 4 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน

หมายเหตุ: (ก) เส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture),
(ข) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ค) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ง) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C,
(จ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C,
(ฉ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C,
(ช) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1,

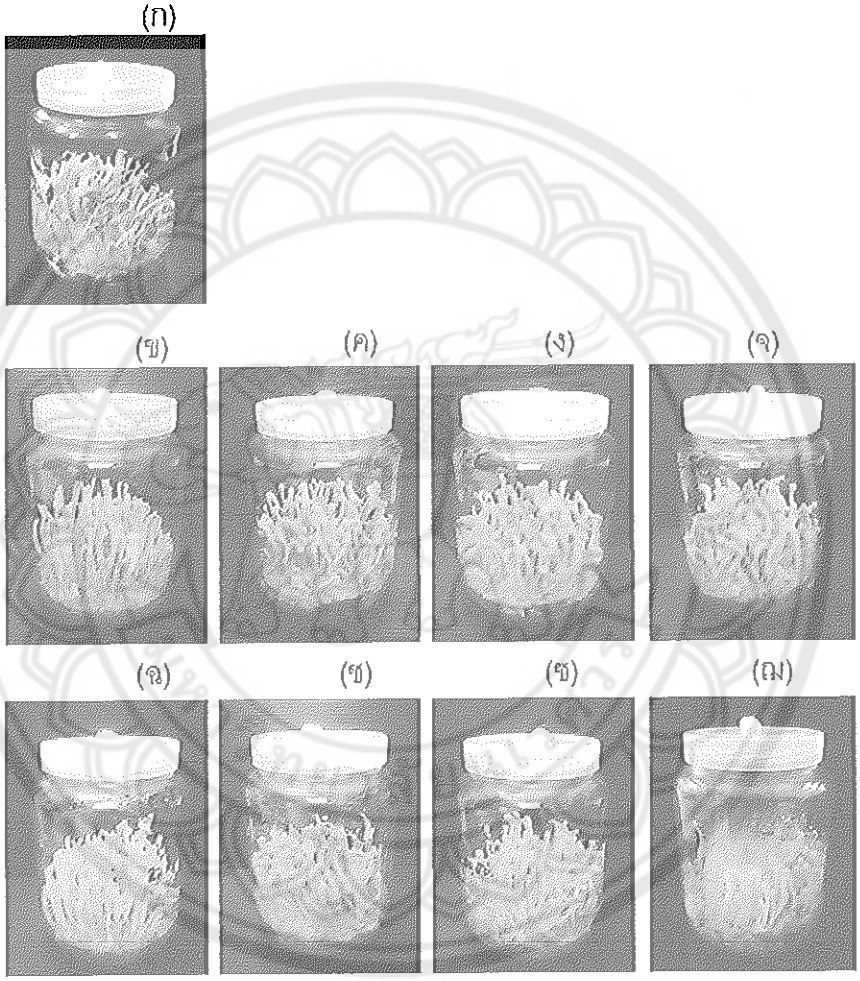
(ฆ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2,
(ฌ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3



ภาพ 48 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 8 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน

หมายเหตุ: (ก) เส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture),
(ข) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ค) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ง) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C,
(จ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C,

(ฉ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C,
(ช) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1,
(ซ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2,
(ฌ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3



ภาพ 49 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดอก (stroma) ของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาด้วยเทคนิคที่แตกต่างกันเป็นเวลา 12 เดือน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นเวลา 60 วัน

หมายเหตุ: (ก) เส้นใยของกล้าเชื้อเริ่มต้น (original culture),
(ข) วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,
(ค) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%,

(ง) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C,
(จ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C,
(ฉ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C,
(ช) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1,
(ซ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 2,
(ฌ) วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3

2.2 ความแน่นเนื้อ (firmness) ของดอก

จากการประเมินค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยนำเส้นใยที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันในเดือนที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในหารเหลว PDB และอาหารข้าวตามลำดับ เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด (stroma) เป็นระยะเวลา 60 วัน จากการทดลองพบว่า ค่าความแน่นเนื้อของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่วัดได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังตาราง 33 ดังนี้

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความแน่นเนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.25-0.51 นิวตัน (N) โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.29 N ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 0.51 N

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความแน่นเนื้อให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 โดยค่าความแน่นเนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.25-0.46 N โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.29 N ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 0.46 N

ในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความแน่นเนื้อให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองในเดือนที่ 4 และเดือนที่ 8 โดยค่าความแน่นเนื้อมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.25-0.46 N โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 มีค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.29 N ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 0.45 N

2.3 **ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ** (Total soluble solid; TSS)

จากการประเมินค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TSS) ของดอกเห็ดโดยนำเส้นใยที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันในเดือนที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในหารเหลว PDB และอาหารข้าวตามลำดับ เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด (stroma) เป็นระยะเวลา 60 วัน จากการทดลองพบว่า ค่า TSS ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่วัดได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังตาราง 33 ดังนี้

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่า TSS มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12.20 ถึง 13.30% โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ให้ค่า TSS สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.30%, 13.23%, 13.30%, 13.20% และ 13.23% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.33% ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า TSS ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 12.20%

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่า TSS มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12.96 ถึง 13.43% โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า TSS สูงและ

ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.43%, 13.36%, 13.33%, 13.33%, 13.43% และ 13.26% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.33% ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า TSS ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 12.96%

ในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่า TSS ที่วัดได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับเดือนที่ 8 โดยค่า TSS มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 13.13-13.46% โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า TSS สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.36%, 13.33%, 13.36%, 13.36%, 13.46% และ 13.46% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.33% ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า TSS ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 13.13%

ตาราง 33 การคงสภาพ (stability) ความแน่นเนื้อ (firmness) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำ (Total soluble solid; TSS) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน

Preservation method	Stability					
	Firmness (kg cm^{-2})			TSS (%)		
	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months
Before preservation (control)	0.29 ^{b} ± 0.02	0.29 ^{b} ± 0.02	0.29 ^{b} ± 0.02	13.33 ^{a} ± 0.11	13.33 ^{ab} ± 0.11	13.33 ^{ab} ± 0.11
Freezing at -80°C	0.26 ^{b} ± 0.02	0.25 ^{b} ± 0.02	0.27 ^{b} ± 0.01	13.30 ^{a} ± 0.10	13.43 ^{a} ± 0.20	13.36 ^{ab} ± 0.05
Chilling storage at 5°C in;						
10% (v/v) glycerol at 5°C	0.27 ^{b} ± 0.01	0.25 ^{b} ± 0.01	0.26 ^{b} ± 0.02	13.23 ^{a} ± 0.05	13.36 ^{ab} ± 0.05	13.33 ^{ab} ± 0.05
rice grains dried at 35°C	0.25 ^{b} ± 0.04	0.25 ^{b} ± 0.01	0.28 ^{b} ± 0.02	13.30 ^{a} ± 0.10	13.33 ^{ab} ± 0.20	13.36 ^{ab} ± 0.05
rice grains dried at 45°C	0.27 ^{b} ± 0.02	0.25 ^{b} ± 0.03	0.26 ^{b} ± 0.02	13.20 ^{a} ± 0.10	13.33 ^{ab} ± 0.15	13.36 ^{ab} ± 0.15
rice grains dried at 55°C	0.29 ^{b} ± 0.01	0.27 ^{b} ± 0.02	0.28 ^{b} ± 0.01	13.23 ^{a} ± 0.05	13.43 ^{a} ± 0.15	13.46 ^{a} ± 0.15
PDA 1st subculture	0.28 ^{b} ± 0.15	0.27 ^{b} ± 0.02	0.270 ^{b} ± 0.01	12.96 ^{b} ± 0.15	13.26 ^{ab} ± 0.05	13.46 ^{a} ± 0.05
PDA 2nd subculture	0.27 ^{b} ± 0.04	0.28 ^{b} ± 0.01	0.26 ^{b} ± 0.02	12.80 ^{b} ± 0.10	13.16 ^{bc} ± 0.05	13.20 ^{bc} ± 0.10
PDA 3rd subculture	0.51 ^{a} ± 0.06	0.46 ^{a} ± 0.04	0.42 ^{a} ± 0.02	12.20 ^{c} ± 0.10	12.96 ^{c} ± 0.05	13.13 ^{c} ± 0.05

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2.4 สีของดอกเห็ด

เมื่อนำเส้นใยที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันในเดือนที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB และอาหารข้าวตามลำดับ เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด (stroma) เป็นระยะเวลา 60 วัน แล้วประเมินค่าสีของดอกเห็ด โดยแสดงผลค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) จากการทดลองพบว่า ค่าสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่วัดได้ให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังตาราง 34 ดังนี้

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความสว่าง (L*) มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 41.99-57.84 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ให้ค่า L* ต่ำและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.70, 42.56, 42.52, 42.26 และ 41.99 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.53 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า L* สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 57.84 นอกจากนี้ยังพบดอกเห็ดที่มีสีขาวเกิดขึ้นในสภาวะดังกล่าว

สำหรับค่าสีแดง (a*) ในเดือนที่ 4 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 22.84-24.49 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า a* สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.32, 24.49, 24.51, 24.29, 23.99 และ 23.78 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.40 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า a* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 22.84

สำหรับค่าสีเหลือง (b*) ในเดือนที่ 4 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 44.16-52.91 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่

อุณหภูมิ 45°C, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า a* สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.73, 52.32, 52.56, 52.91, 52.70, 51.14 และ 51.42 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.73 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า a* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 44.16

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับเดือนที่ 4 โดยค่าความสว่าง (L*) มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 42.37-55.58 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ให้ค่า L* ต่ำและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 43.07, 42.37, 42.90, 43.14 และ 43.03 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.53 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า L* สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 55.58 นอกจากนี้ยังพบดอกเห็ดที่มีสีขาวเกิดขึ้นในสภาวะดังกล่าว

สำหรับค่าสีแดง (a*) ในเดือนที่ 8 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 20.85-26.46 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า a* สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.50, 23.80, 24.56, 25.46, 26.26 และ 24.53 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.40 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า a* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20.85

สำหรับค่าสีเหลือง (b*) ในเดือนที่ 8 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 45.95-55.52 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า b* สูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.73 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า b* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 45.95

ในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ให้ผลในลักษณะเดียวกันกับเดือนที่ 4 และเดือนที่ 8 โดยค่าความสว่าง (L*) มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 42.25-54.54 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C และ วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ให้ค่า L* ต่ำและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 43.29, 42.25, 43.38, 43.52 และ 43.63 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.53 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า L* สูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 54.54 นอกจากนี้ยังพบดอกเห็ดที่มีสีขาวเกิดขึ้นในสภาวะดังกล่าว

สำหรับค่าสีแดง (a*) ในเดือนที่ 12 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 20.81-24.39 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ค่า a* สูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.39, 24.33, 24.00, 23.44, 23.18 และ 23.37 ตามลำดับ ซึ่งให้ผล ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.40 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า a* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 20.81

สำหรับค่าสีเหลือง (b*) ในเดือนที่ 12 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 44.82-54.41 โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง ยกเว้นเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า b* สูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.73 ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่า a* ต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 44.82

ตาราง 34 การคงสภาพ (stability) ค่าสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน

Preservation method	Stability								
	L*			a*			b*		
	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months
Before preservation *(control)*	42.53 ^{c} ± 0.83	42.53 ^{c} ± 0.83	42.53 ^{c} ± 0.83	24.40 ^{a} ± 0.45	24.40 ^{ab} ± 0.45	24.40 ^{a} ± 0.45	52.73 ^{a} ± 0.40	52.73 ^{a} ± 0.40	52.73 ^{a} ± 0.40
Freezing at -80°C	42.70 ^{c} ± 0.44	43.07 ^{c} ± 0.88	43.29 ^{c} ± 0.83	24.32 ^{a} ± 0.26	25.50 ^{a} ± 1.09	24.39 ^{a} ± 0.98	52.32 ^{a} ± 1.26	54.51 ^{a} ± 1.68	53.83 ^{a} ± 1.52
Chilling storage at 5°C in;									
10% *(v/v)* glycerol at 5°C	42.56 ^{c} ± 0.21	42.37 ^{c} ± 1.29	42.25 ^{c} ± 0.99	24.49 ^{a} ± 0.55	23.80 ^{ab} ± 2.54	24.33 ^{a} ± 1.02	52.56 ^{a} ± 1.02	55.52 ^{a} ± 2.06	54.34 ^{a} ± 1.21
rice grains dried at 35°C	42.52 ^{c} ± 0.59	42.90 ^{c} ± 0.33	43.38 ^{c} ± 2.11	24.51 ^{a} ± 0.52	24.56 ^{ab} ± 1.86	24.00 ^{a} ± 1.38	52.91 ^{a} ± 0.48	53.70 ^{a} ± 0.95	53.62 ^{a} ± 2.17
rice grains dried at 45°C	42.26 ^{c} ± 0.27	43.14 ^{c} ± 0.68	43.52 ^{c} ± 1.83	24.29 ^{ab} ± 0.23	25.46 ^{a} ± 0.95	23.44 ^{a} ± 1.05	52.70 ^{a} ± 0.53	52.81 ^{a} ± 0.64	53.67 ^{a} ± 1.16
rice grains dried at 55°C	41.99 ^{c} ± 0.13	43.03 ^{c} ± 0.80	43.63 ^{c} ± 2.12	23.99 ^{ab} ± 0.13	26.26 ^{a} ± 1.33	23.18 ^{ab} ± 1.00	51.14 ^{ab} ± 0.81	54.01 ^{a} ± 2.32	54.41 ^{a} ± 0.60
PDA 1st subculture	55.03 ^{b} ± 1.04	46.94 ^{b} ± 0.60	48.38 ^{b} ± 1.08	23.78 ^{ab} ± 0.38	24.53 ^{ab} ± 0.51	23.37 ^{a} ± 0.81	51.42 ^{a} ± 0.96	52.20 ^{a} ± 1.00	52.45 ^{a} ± 1.06
PDA 2nd subculture	57.00 ^{a} ± 0.39	48.13 ^{b} ±0.62	50.41 ^{b} ± 0.78	23.60 ^{b} ± 0.45	22.11 ^{bc} ± 0.99	21.55 ^{bc} ± 1.11	49.49 ^{b} ± 0.75	53.89 ^{a} ± 1.93	52.86 ^{a} ± 0.22
PDA 3rd subculture	57.84 ^{a} ± 0.41	55.58 ^{a} ± 1.11	54.54 ^{a} ± 1.09	22.84 ^{c} ± 0.41	20.85 ^{c} ± 0.28	20.81 ^{c} ± 0.63	44.16 ^{c} ± 1.76	45.95 ^{b} ± 2.73	44.82 ^{b} ± 0.53

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เมื่อนำเส้นใยที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันในเดือนที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษามาเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเพื่อให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ด (stroma) เป็นระยะเวลา 60 วัน แล้วทำการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ 2 ชนิดคือ สารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน จากการทดลองพบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารอคร์ไดเซปินให้ผลในลักษณะเดียวกันทั้งสามช่วงการทดสอบ ดังตาราง 35 ดังนี้

ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา พบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 161.90-609.28 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C ให้ปริมาณสารอะนีโนซีนสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 609.0, 609.28 และ 593.04 mg kg^{-1} ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 619.41 mg kg^{-1} ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 161.90 mg kg^{-1}

สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเดือนที่ 4 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 549.47-3,511.95 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,511.95, 3,452.93 และ 3,354.37 mg kg^{-1} ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,576.60 mg kg^{-1} ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 549.47 mg kg^{-1}

ในเดือนที่ 8 ของการเก็บรักษา พบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 154.50-632.45 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C และ เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 1 ให้ปริมาณสารอะนีโนซีนสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ

โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 632.45, 574.34, 594.77, 604.50 และ 602.73 mg kg^{-1} ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 619.41 mg kg^{-1} ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 154.50 mg kg^{-1}

สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเดือนที่ 8 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 527.25 ถึง 3,538.59 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,538.59, 3,208.29 และ 3,150.03 mg kg^{-1} ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,576.60 mg kg^{-1} ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 527.25 mg kg^{-1}

ในเดือนที่ 12 ของการเก็บรักษา พบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินให้ผลในลักษณะเดียวกันกับเดือนที่ 4 และเดือนที่ 8 โดยปริมาณสารอะดีโนซีนมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 175.04-692.59 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ให้ปริมาณสารอะนีโนซีนสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 692.59, 539.64, 577.25, 578.38 และ 530.64 mg kg^{-1} ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 619.41 mg kg^{-1} ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 175.04 mg kg^{-1}

สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเดือนที่ 12 มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 843.40 ถึง 3,644.79 mg kg^{-1} โดยเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,644.79 mg kg^{-1} ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) ที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,576.60 mg kg^{-1} รองลงมาคือเส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3,166.0 และ 3,190.71 mg kg^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินต่ำสุดเฉลี่ยเท่ากับ 843.40 mg kg^{-1}

ตาราง 35 การคงสภาพ (stability) ด้านปริมาณสารอะดีโนซีน (adenosine) และสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่เพาะเลี้ยงจากเส้นใยที่เก็บรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 เดือน

Preservation method	Stability					
	Adenosine (mg kg^{-1})			Cordycepin (mg kg^{-1})		
	4 months	8 months	12 months	4 months	8 months	12 months
Before preservation (control)	619.41 ^{a} ± 49.59	619.41 ^{a} ± 49.59	619.41 ^{ab} ± 49.59	3,576.60 ^{a} ± 283.82	3,576.60 ^{a} ± 283.82	3,576.60 ^{ab} ± 283.82
Freezing at -80°C	609.00 ^{ab} ± 65.80	632.45 ^{a} ± 87.98	692.59 ^{a} ± 78.90	3,511.95 ^{a} ± 325.21	3,538.59 ^{a} ± 277.22	3,644.79 ^{a} ± 226.75
Chilling storage at 5°C in;						
10% (v/v) glyceroi at 5°C	609.28 ^{ab} ± 46.18	574.34 ^{ab} ± 52.14	539.64 ^{ab} ± 5.50	3,452.93 ^{a} ± 266.35	3,208.29 ^{a} ± 146.39	3,166.00 ^{b} ± 39.59
rice grains dried at 35°C	593.04 ^{ab} ± 22.24	594.77 ^{ab} ± 151.95	577.25 ^{ab} ± 83.58	3,354.37 ^{a} ± 34.08	3,150.03 ^{a} ± 382.10	3,190.71 ^{b} ± 371.39
rice grains dried at 45°C	409.98 ^{c} ± 34.44	479.59 ^{b} ± 30.17	578.38 ^{ab} ± 87.28	2,378.96 ^{b} ± 220.50	2,511.65 ^{b} ± 387.25	2,427.39 ^{c} ± 429.93
rice grains dried at 55°C	531.93 ^{b} ± 55.82	604.50 ^{ab} ± 58.69	530.64 ^{ab} ± 186.49	1,433.24 ^{c} ± 291.87	1,535.00 ^{c} ± 107.45	1,567.79 ^{d} ± 289.48
PDA 1st subculture	448.32 ^{c} ± 22.23	602.73 ^{ab} ± 73.98	493.91 ^{b} ± 115.06	1,428.71 ^{c} ± 91.01	1,491.04 ^{c} ± 296.58	1,285.23 ^{d} ± 137.89
PDA 2nd subculture	272.96 ^{d} ± 49.79	238.64 ^{c} ± 4.89	234.01 ^{c} ± 14.10	1,063.62 ^{c} ± 37.78	909.51 ^{d} ± 32.01	843.40 ^{e} ± 31.73
PDA 3rd subculture	161.90 ^{e} ± 45.45	154.50 ^{c} ± 14.44	175.04 ^{c} ± 50.29	549.47 ^{d} ± 53.89	527.25 ^{d} ± 116.38	557.01 ^{e} ± 76.05

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลการทดลองที่ 5 การศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS)

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) ให้ผลการทดลองดังนี้

1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จำนวน 39 ตัวอย่าง โดยวิธีมาตรฐาน HPLC เพื่อใช้ในการสร้างและทดสอบสมการ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการ (calibration set) จำนวน 20 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้เพื่อการทำนาย (validation set) จำนวน 19 ตัวอย่าง แสดงผลในตาราง 36 จากตารางพบว่า ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของสารอะดีโนซีนในกลุ่ม calibration set มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 254.57 และ 769.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของสารอะดีโนซีนในกลุ่ม validation set มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 255.84 และ 670.82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยค่า Standard Error of the Laboratory (SEL) ของการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนมีค่าเท่ากับ 36.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของสารคอร์ไดเซปินในกลุ่ม calibration set มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 700.05 และ 9,677.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของสารคอร์ไดเซปินในกลุ่ม validation set มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 734.90 และ 9,336.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ โดยค่า SEL ของการวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินมีค่าเท่ากับ 289.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตาราง 36 ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่วัดด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC โดยกำหนดให้ใช้เพื่อการสร้างสมการ (calibration set) จำนวน 20 ตัวอย่าง และใช้เพื่อการทดสอบสมการ (validation set) จำนวน 19 ตัวอย่าง

Adenosine (mg kg^{-1})		Cordycepin (mg kg^{-1})	
Calibration	Validation	Calibration	Validation
483.32	498.00	742.65	734.90
478.11	571.07	1192.81	777.23
565.70	670.82	1184.90	1,222.67
549.01	658.71	967.73	965.71
682.23	447.07	1,042.25	919.10
465.01	374.24	978.67	1,020.57
438.27	367.35	700.05	748.18
409.47	503.74	2,143.13	756.01
521.86	625.77	2,217.06	2,084.9
534.39	650.67	969.56	967.72
626.43	423.09	1,107.25	949.07
465.88	255.84	1,094.23	1,041.37
440.30	272.12	5,197.28	5,197.00
254.57	554.48	1,770.26	5,777.13
548.57	413.95	1,267.21	1,494.37
469.68	359.65	6,038.69	5,938.83
401.75	633.05	3,799.50	5,546.34
688.03	547.10	3,590.31	3,250.46
769.81	617.11	9,335.14	9,336.03
544.56		9,677.19	
SEL = 36.19		SEL = 289.66	

2. การวิเคราะห์สเปกตรัมของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งสเปกตรัม (original spectrum)

ในการวิเคราะห์สเปกตรัมของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเตรียมให้แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ ดอกสด ดอกสดสับละเอียด ดอกอบแห้งที่บดเป็นผง และสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว ด้วยเครื่อง NIR spectrometer (Bruker, Matrix-F duplex, Germany) ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) 12500-3500 cm^{-1} หรือความยาวคลื่น (wavelength) เท่ากับ 700-2500 นาโนเมตร พบว่า ตัวอย่างดอกสด และตัวอย่างดอกสดสับละเอียดมีการดูดซับคลื่นที่เลขคลื่นใกล้เคียงกัน คือที่ 10253, 8384, 6904 และ 5188 cm^{-1} สำหรับตัวอย่างรูปแบบเห็ดสด และที่เลขคลื่น 10246, 8392, 6919 และ 5137 cm^{-1} สำหรับตัวอย่างในรูปแบบเห็ดสดสับละเอียด ดังภาพ 50 (ก) และ (ข) ส่วนเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างดอกแห้งบดเป็นผง และตัวอย่างสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว พบว่ามีตำแหน่งการดูดซับมากขึ้น โดยตัวอย่างดอกแห้งบดเป็นผง มีการดูดซับที่เลขคลื่น 8392, 7232, 6728, 6334, 5772, 5164, 4746 และ 4305 cm^{-1} ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วมีการดูดซับที่เลขคลื่น 7341, 7235, 5440, 5342, 5160, 4752, 4377 และ 4312 cm^{-1} ตามลำดับ ดังภาพ 50 (ค) และ (ง) เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่พบการดูดซับที่เลขคลื่น 10253 หรือ 10246 cm^{-1} และ 6904 หรือ 6919 cm^{-1} เหมือนที่ปรากฏในตัวอย่างดอกสดและดอกสดสับละเอียด นอกจากนี้เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วมีลักษณะการเกิด noise ที่ชัดเจน สำหรับพันธะชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งของเลขคลื่นที่ดูดซับแสงในย่าน NIR จากผลการทดลองแสดงในตาราง 37

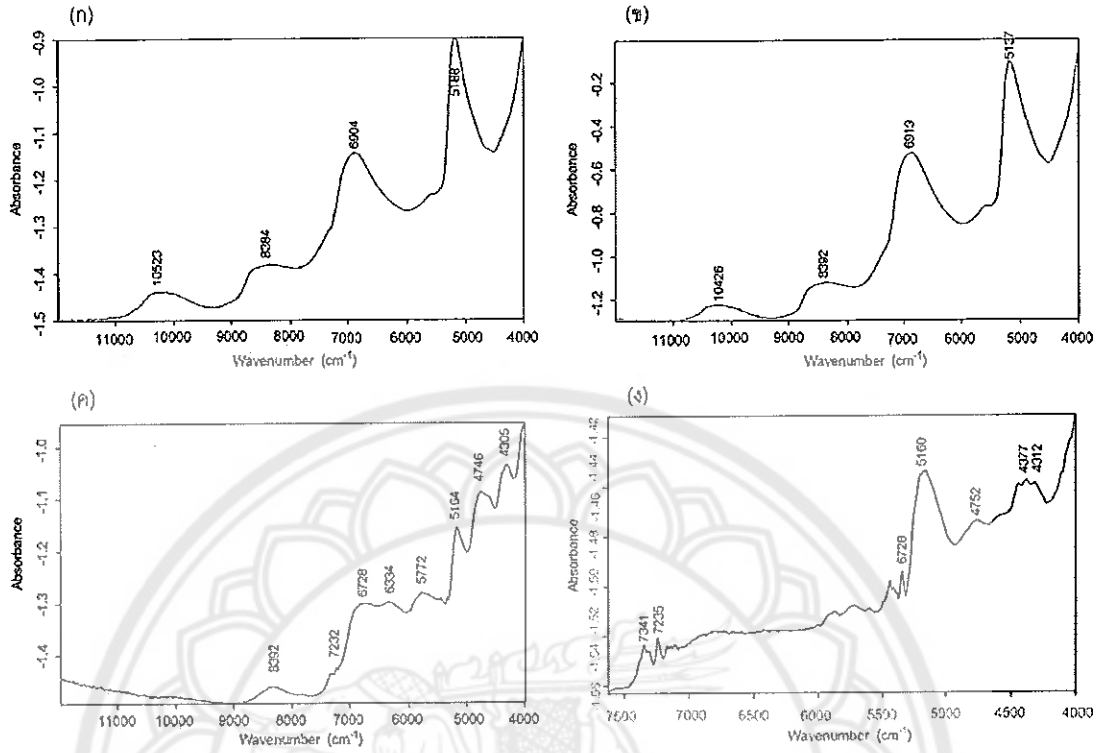
2.2 สเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง (preprocessing spectrum)

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการปรับแต่งสเปกตรัมเบื้องต้น 2 วิธี คือ วิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) ก่อนการสร้างสมการเพื่อลดอิทธิพลการเบี่ยงเบนของสเปกตรัมที่อาจจะเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ ที่ควบคุมไม่ได้ พบว่าเส้นสเปกตรัมของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ ที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE จะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุด คือ มีค่าเท่ากับศูนย์ ทำให้การขยับขึ้นของเบสไลน์ (baseline shift) เชิงเส้นลดลง ดังภาพ 51 (ก-ง) ส่วนวิธี SNV พบว่า จะทำให้ความสูงของแถบการดูดซับลดลงแต่โครงสร้างข้อมูลของเส้นสเปกตรัมยังคงอยู่ ดังภาพ 52 (ก-ง)

ตาราง 37 พันธะชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับตำแหน่งของเลขคลื่นที่ดูดซับแสงในย่าน NIR

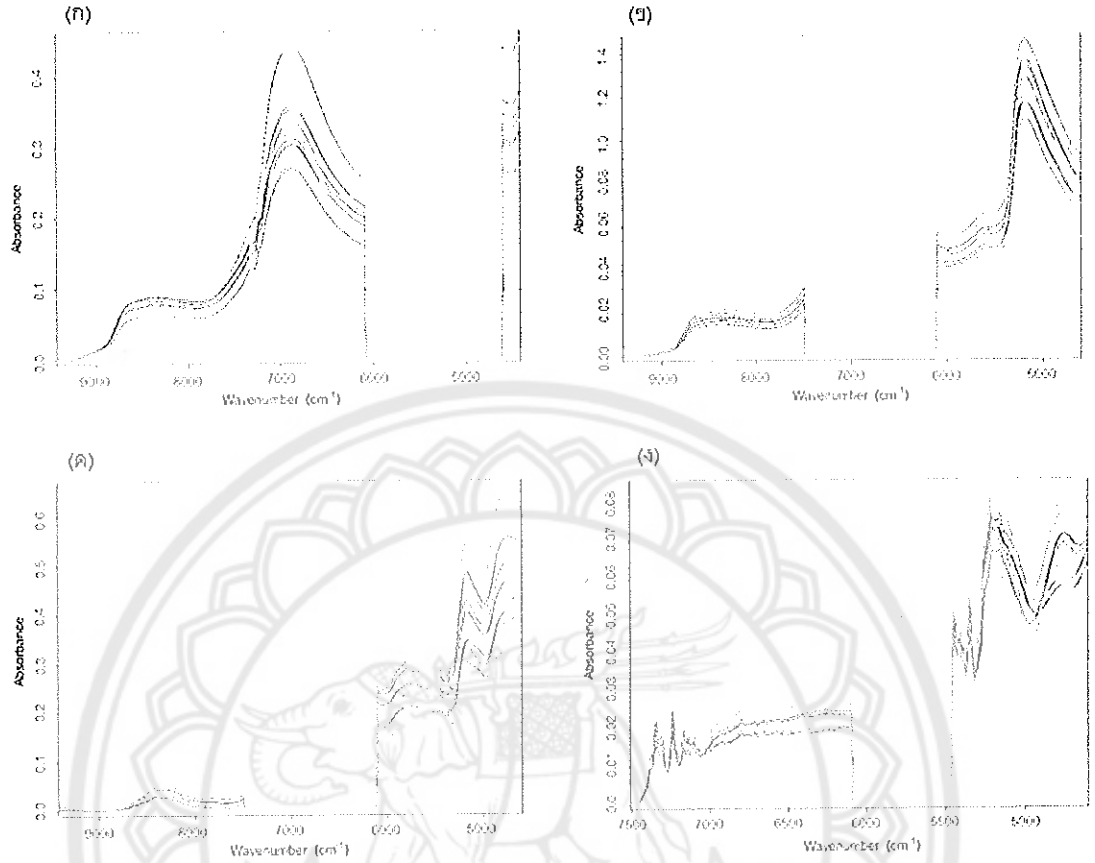
Wavenumber (cm^{-1})	Bond Vibration	Compound	Reference
10253, 10246	OH anti-sym. stret.+OH sym. stret. second overtone	Water	- Siesler et al., 2002
8392, 8384	-CH second overtone	Carbohydrate	- Siesler et al. (2002) - Türker-Kaya and Huck. (2017)
7341, 7235, 7232	2×CH stret.+CH bend.	Carbohydrate	- Siesler et al. (2002) - Türker-Kaya and Huck. (2017)
6919, 6904	Combination of 2×CH stret.+CH bend. OH first overtone	Carbohydrate Water	- Siesler et al. (2002)
6728, 6334	$-NH_2$ first overtone	Protein	- Siesler et al. (2002) - Türker-Kaya and Huck. (2017)
5772	-CH first overtone	Carbohydrate	- Siesler et al. (2002)
5188, 5164, 5160, 5137,	Combination of OH stret.+OH bend.	Water, Carbohydrate	- Siesler et al. (2002) - López, García-González and Franco-Robles (2017)
4752, 4746	Combination of NH stret.+ amide	Protein	- Siesler et al. (2002)
4377, 4312, 4305	Combination of CH stret.+CH bend.	Protein	- Siesler et al. (2002) - Türker-Kaya and Huck. (2017)

stret. = stretching, bend. = bending



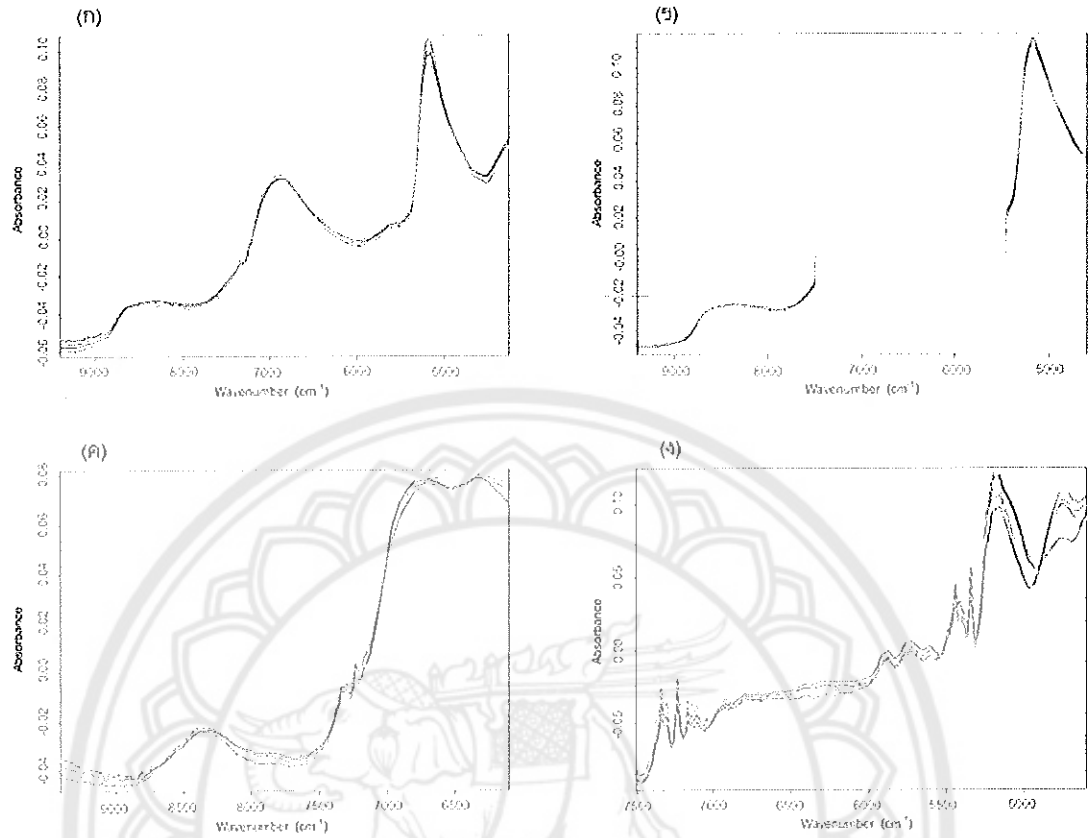
ภาพ 50 สเปกตรัม (Original spectrum) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

หมายเหตุ: (ก) ดอกสด (ข) ดอกสดสับละเอียด (ค) ดอกอบแห้งที่บดเป็นผง (ง) สารสกัดใน กระดาษกรองใยแก้ว ที่วัดด้วยเครื่อง NIR spectrometer (Bruker, Matrix-F duplex, Germany)



ภาพ 51 สเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง (preprocessing spectrum) **โดยวิธี** constant offset elimination (COE) **ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง**

หมายเหตุ: (ก) ดอกสด (ข) ดอกสดสับละเอียด (ค) ดอกแห้งที่บดเป็นผง (ง) สารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่วัดด้วยเครื่อง NIR spectrometer (Bruker, Matrix-F duplex, Germany)



ภาพ 52 สเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง (preprocessing spectrum) โดยวิธี vector normalization (SNV) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

หมายเหตุ: (ก) ดอกสด (ข) ดอกสดสับละเอียด (ค) ดอกแห้งที่บดเป็นผง (ง) สารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว ที่วัดด้วยเครื่อง NIR spectrometer (Bruker, Matrix-F duplex, Germany)

3. การสร้างสมการและการทดสอบสมการ

จากการสร้างสมการทำนายโดยนำข้อมูลมาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าจากการดูดซับแสง (absorption) ของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 รูปแบบ กับค่าที่วิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินโดยวิธีมาตรฐาน HPLC โดยแบ่งข้อมูลออกเป็นสองกลุ่ม คือ calibration set และ validation set ในสัดส่วน calibration set ต่อ validation set เท่ากับ 1:1 ดังตาราง 36 ด้วยวิธี Partial Least Squares Regression (PLSR) ในโปรแกรม OPUS version 7.2 (ประเทศเยอรมัน) ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) และสเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง 2 วิธี คือ วิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) โดยทำการตรวจสอบแบบ Test set validation ผลการสร้างและทดสอบสมการดัง Scatter plots ดังภาพ 53 ถึง ภาพ 68 และดังตาราง 38 โดยเมื่อพิจารณาผลการทดสอบเพื่อหาแบบจำลองที่ดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 รูปแบบ ให้ผลดังนี้

3.1 **ตัวอย่างที่เป็นดอกเห็ดสด** (fresh fruiting bodies) พบว่า

3.1.1 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE โดยให้ค่า coefficient of determination of calibration (R^2_c) เท่ากับ 0.98 ค่า standard error of calibration (SEC) เท่ากับ 16.94 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า residual predictive deviation (RPD) เท่ากับ 9.40 ค่า coefficient of determination of prediction (R^2_p) เท่ากับ 0.91 ค่า root mean square error of prediction (RMSEP) เท่ากับ 38.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ -7.55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 3.45 และค่า standard error of prediction (SEP) เท่ากับ 38.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.1.2 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี SNV โดยให้ค่า (R^2_c) เท่ากับ 0.99 ค่า SEC เท่ากับ 331.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 11.40, ค่า R^2_p เท่ากับ 0.97 ค่า RMSEP เท่ากับ 386 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ 86.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 6.54 และค่า SEP เท่ากับ 386.83 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.2 **ตัวอย่างที่เป็นเห็ดสดสับละเอียด** (chopped fresh fruiting bodies) พบว่า

3.2.1 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) โดยให้ค่า R^2_c เท่ากับ 0.94 ค่า SEC เท่ากับ 32.63 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 4.46, ค่า R^2_p เท่ากับ 0.95 ค่า RMSEP เท่ากับ 26.90

มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -8.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 5.04 และค่า SEP เท่ากับ 27.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.2.2 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี COE โดยให้ค่า (R^2_c) เท่ากับ 0.99 ค่า SEC เท่ากับ 248.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 14.60 ค่า R^2_p เท่ากับ 0.98 ค่า RMSEP เท่ากับ 277 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -1.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 8.09 และค่า SEP เท่ากับ 283.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.3 **ตัวอย่างที่เป็นดอกอบแห้งที่บดเป็นผง** (dried powder fruiting bodies) พบว่า

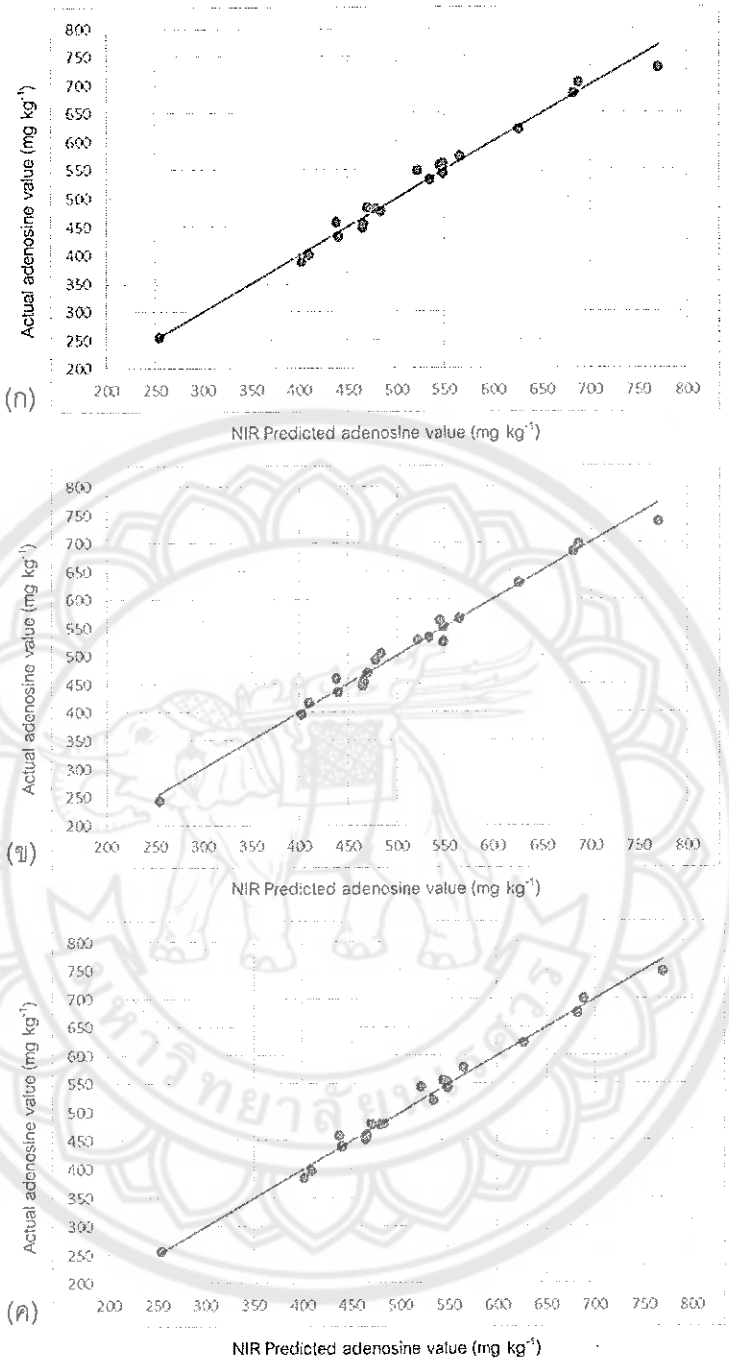
3.3.1 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี SNV โดยให้ค่า R^2_c เท่ากับ 0.92 ค่า SEC เท่ากับ 38.44 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 3.76 ค่า R^2_p เท่ากับ 0.93, ค่า RMSEP เท่ากับ 32.60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -10.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 4.17 และ ค่า SEP เท่ากับ 28.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.3.2 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการปรับแต่งโดยวิธี COE โดยให้ค่า (R^2_c) เท่ากับ 0.99 ค่า SEC เท่ากับ 188.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 21.30 ค่า R^2_p เท่ากับ 0.99 ค่า RMSEP เท่ากับ 196 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -29.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 12.70 และค่า SEP เท่ากับ 198.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.4 **ตัวอย่างที่เป็นสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง** (DESIR: dry extract system for infrared)

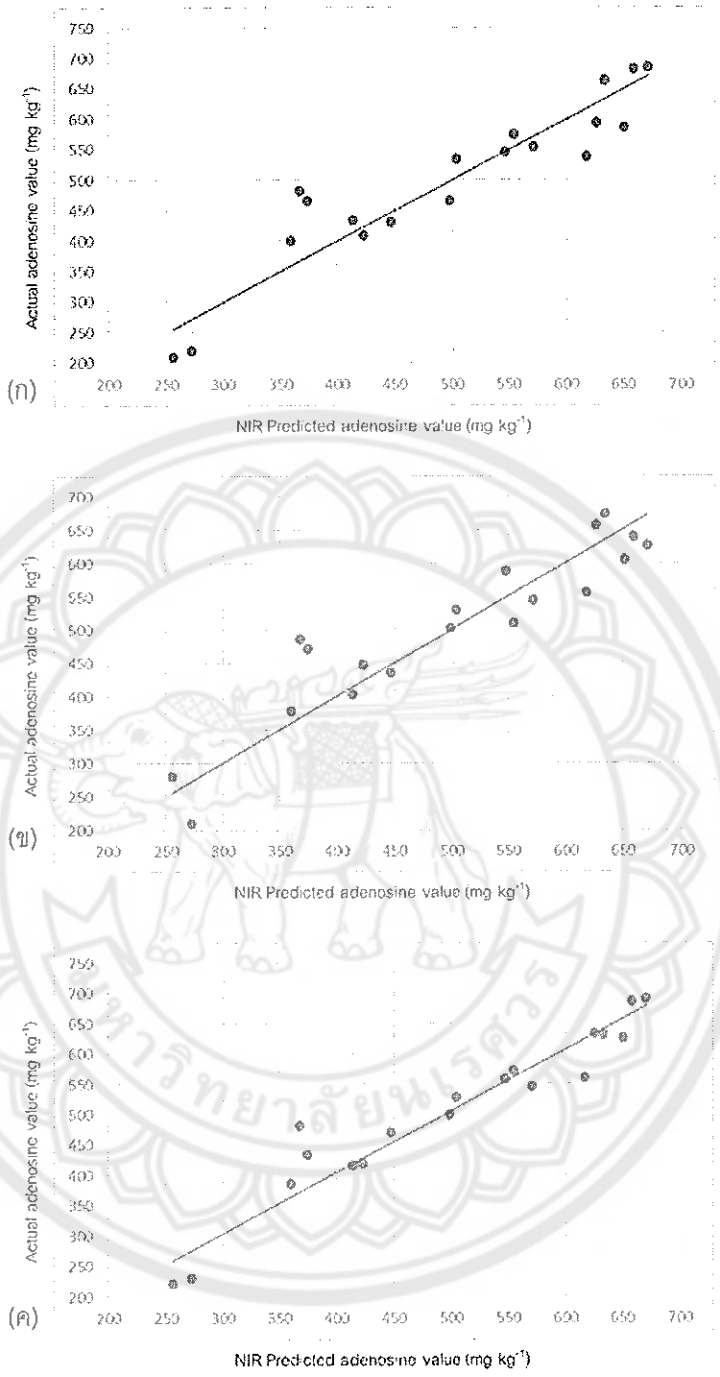
3.4.1 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการจัดการปรับแต่งโดยวิธี SNV โดยให้ค่า R^2_c เท่ากับ 0.88 ค่า SEC เท่ากับ 48.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, ค่า RPD เท่ากับ 3 ค่า R^2_p เท่ากับ 0.88 ค่า RMSEP เท่ากับ 43.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ 3.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 2.97 และค่า SEP เท่ากับ 44.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

3.4.2 แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง โดยให้ค่า (R^2_c) เท่ากับ 0.99 ค่า SEC เท่ากับ 185.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า RPD เท่ากับ 20.50 ค่า R^2_p เท่ากับ 0.98 ค่า RMSEP เท่ากับ 308 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า bias เท่ากับ -69.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, ค่า RPD เท่ากับ 8.21 และ ค่า SEP เท่ากับ 312.89 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม



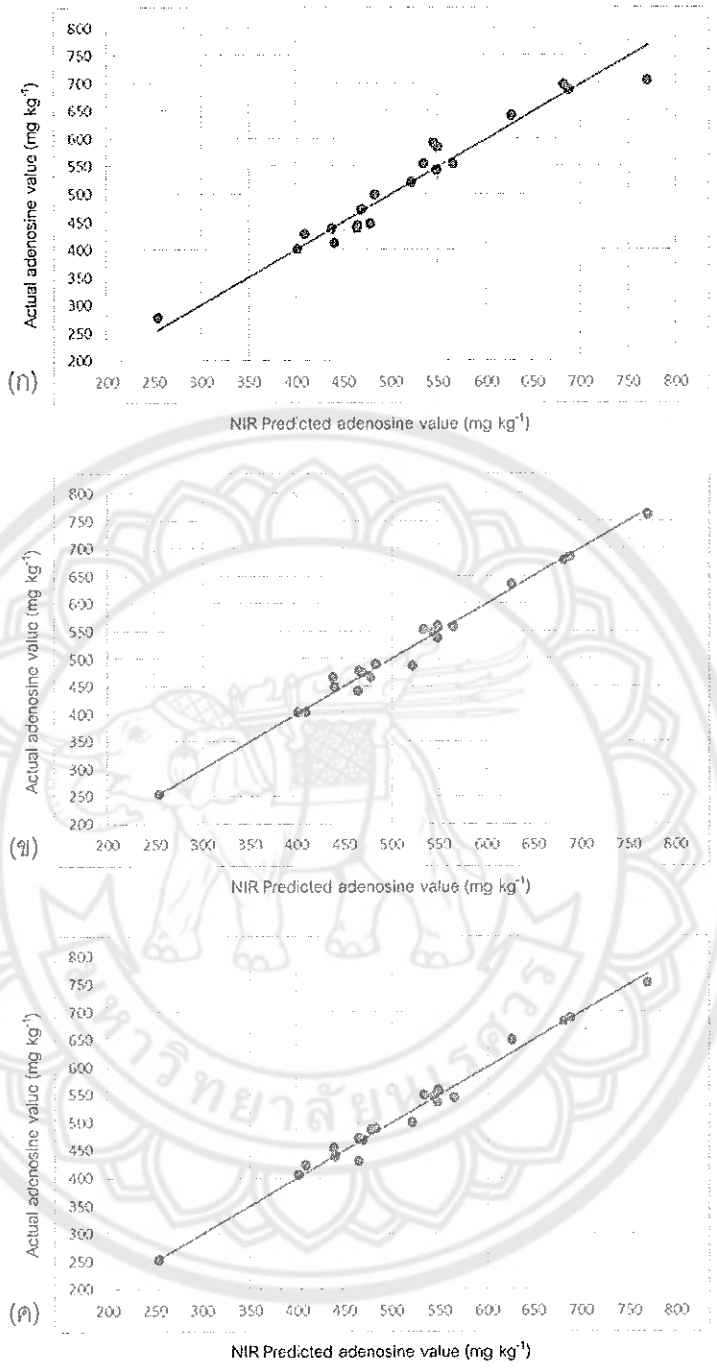
ภาพ 53 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



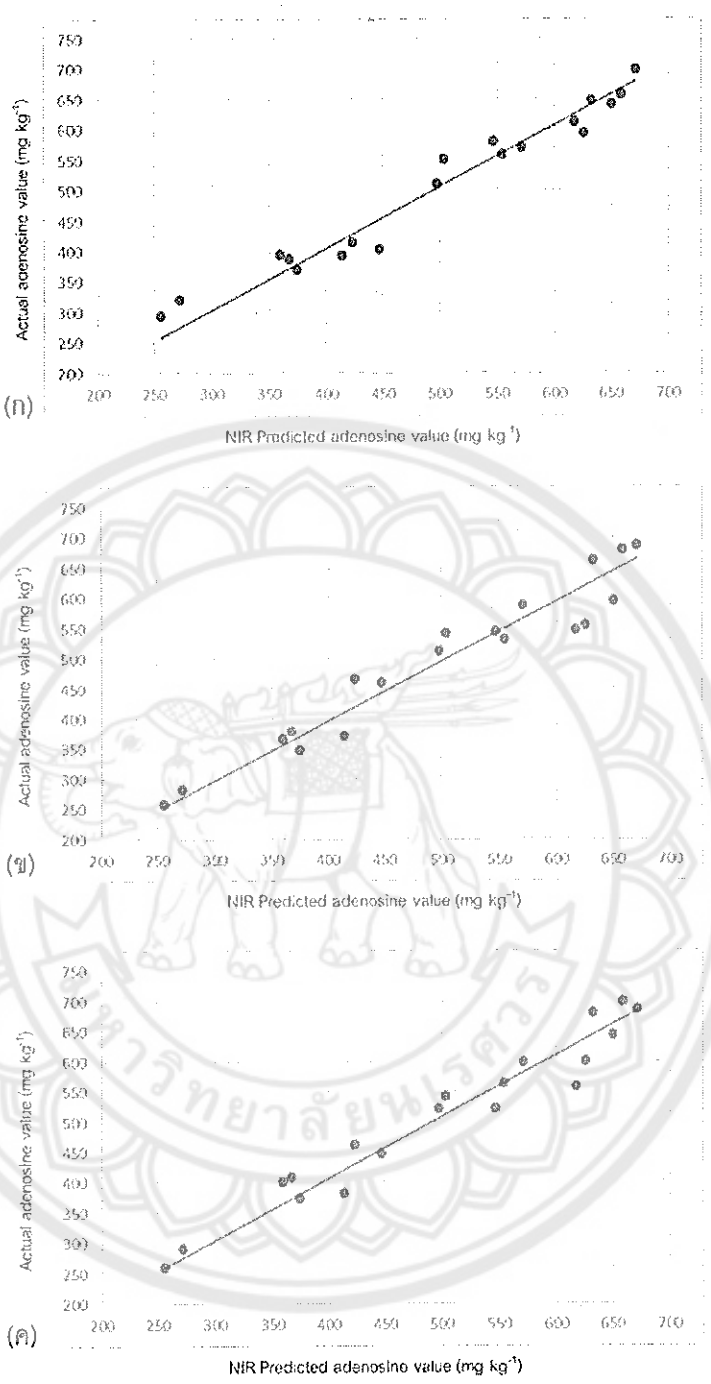
ภาพ 54 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



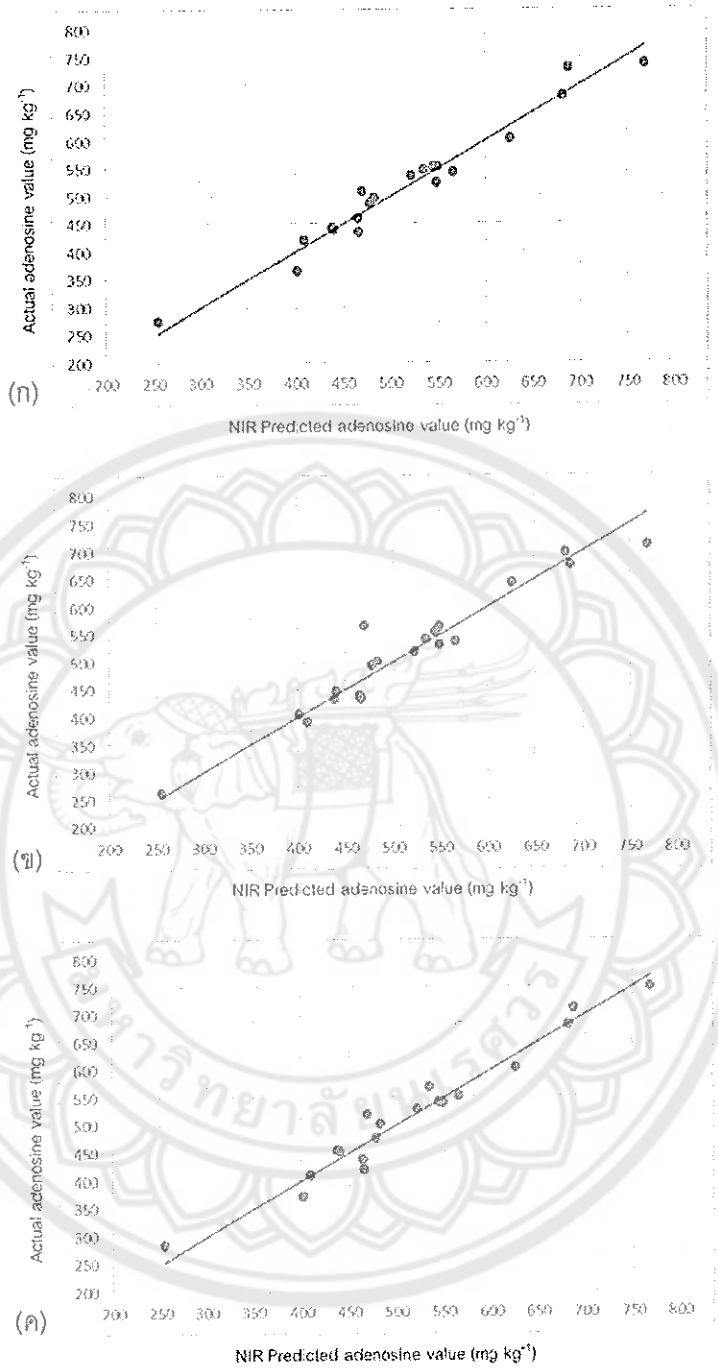
ภาพ 55 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



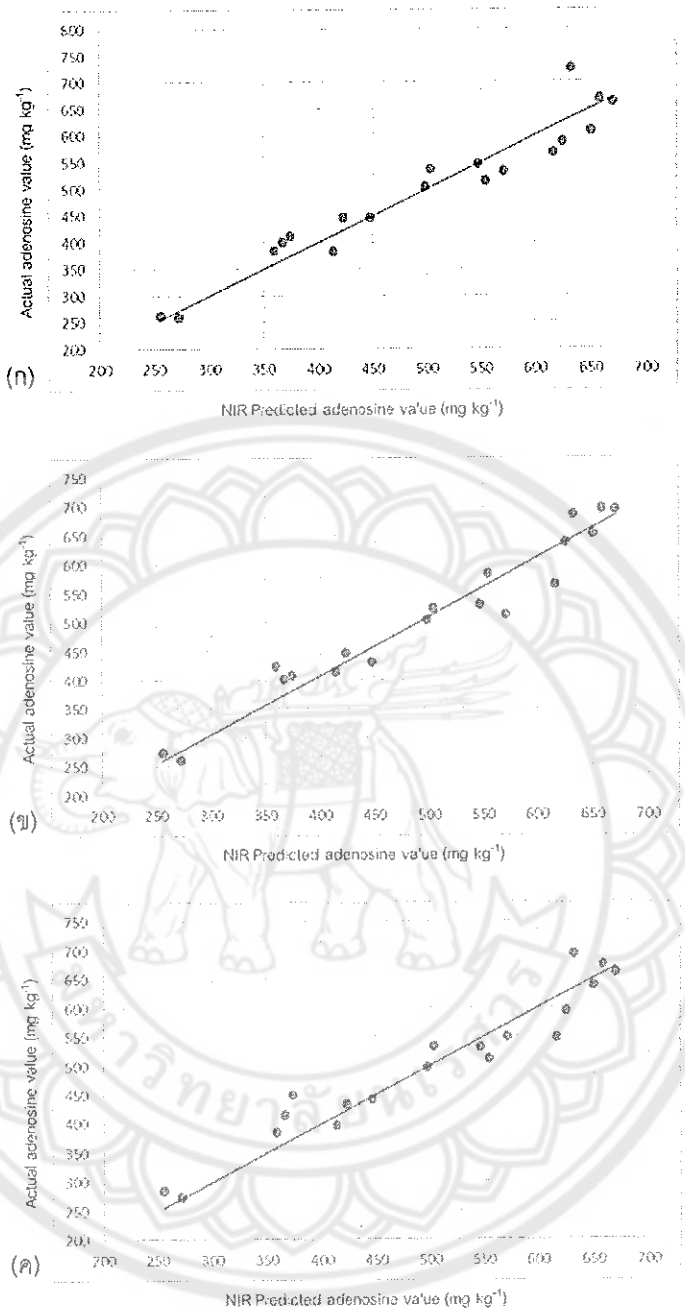
ภาพ 56 Scatter plot ของข้อมูลอ้างอิง (Y) และข้อมูลทำนาย (X) กลุ่ม validation sample set สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



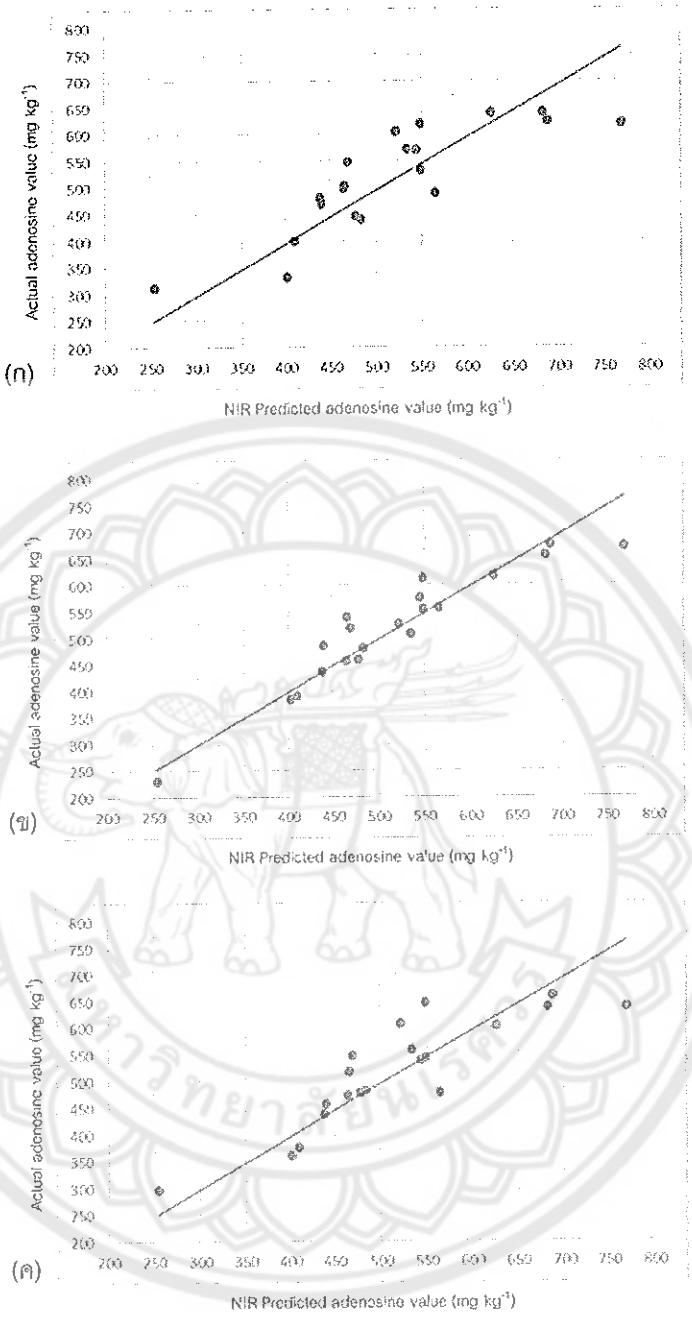
ภาพ 57 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



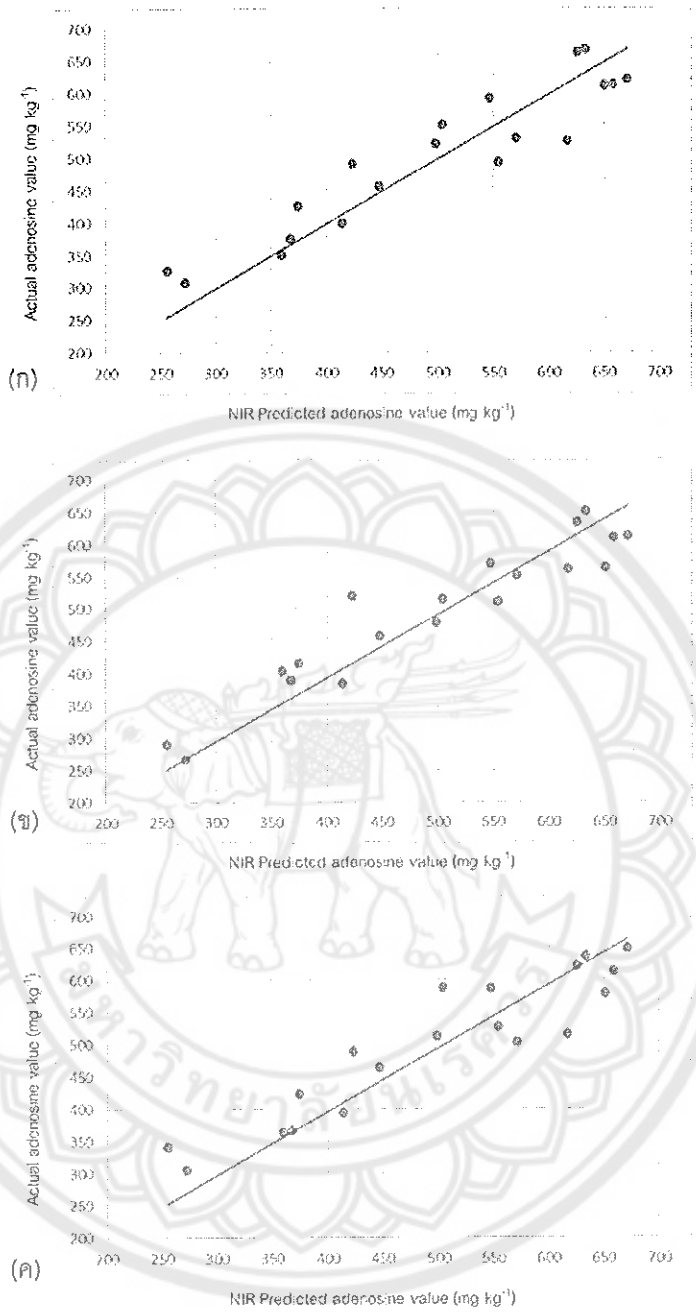
ภาพ 58 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



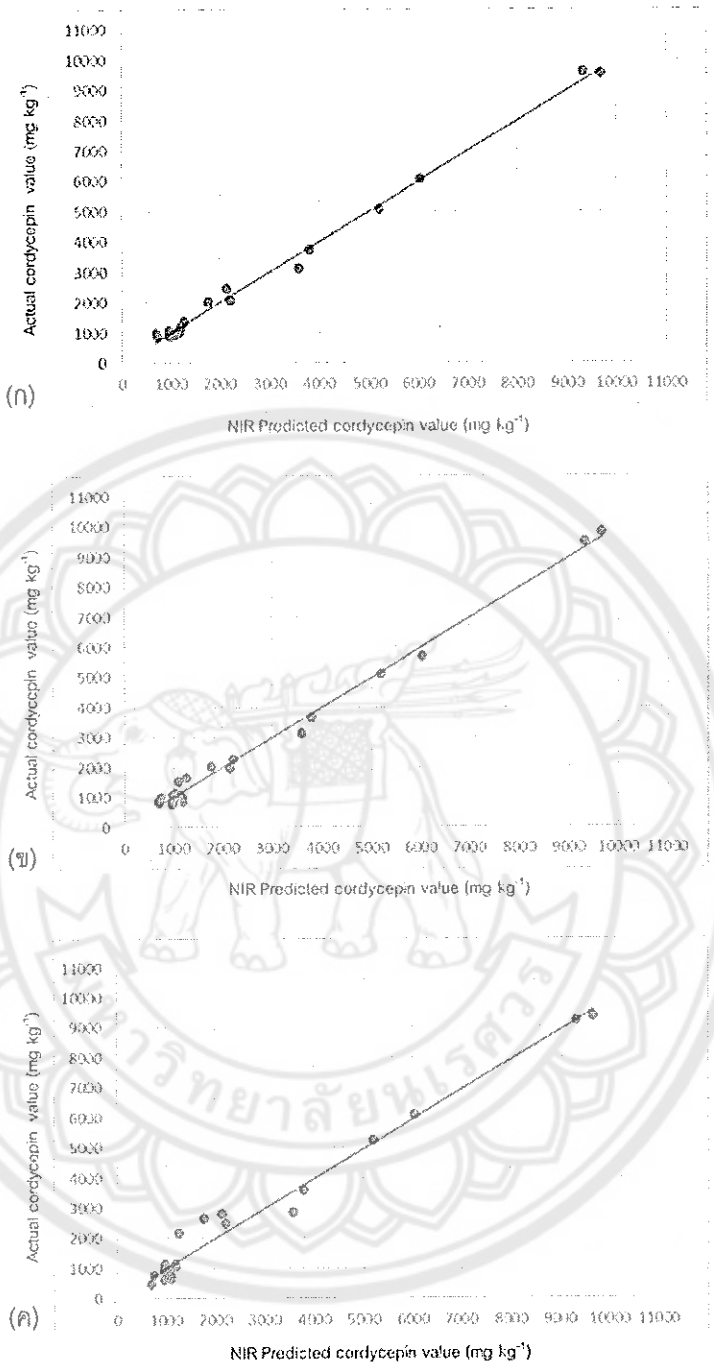
ภาพ 59 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



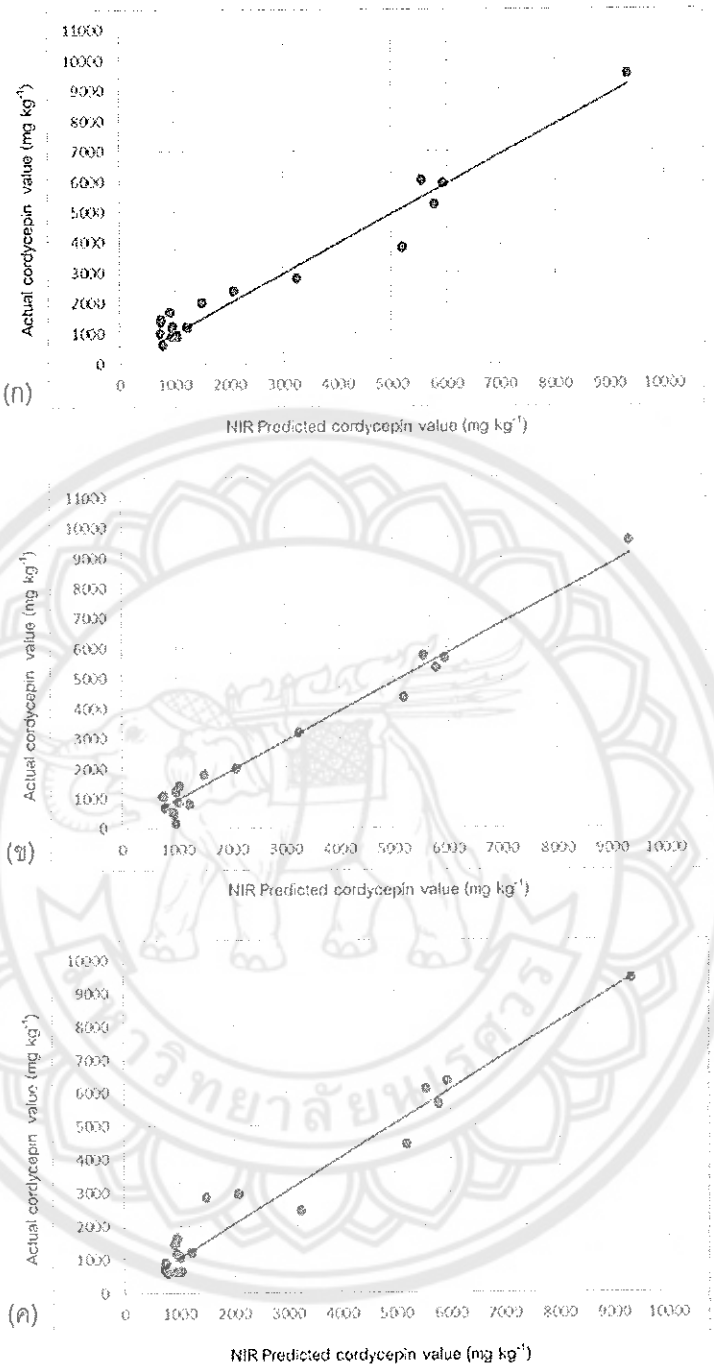
ภาพ 60 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



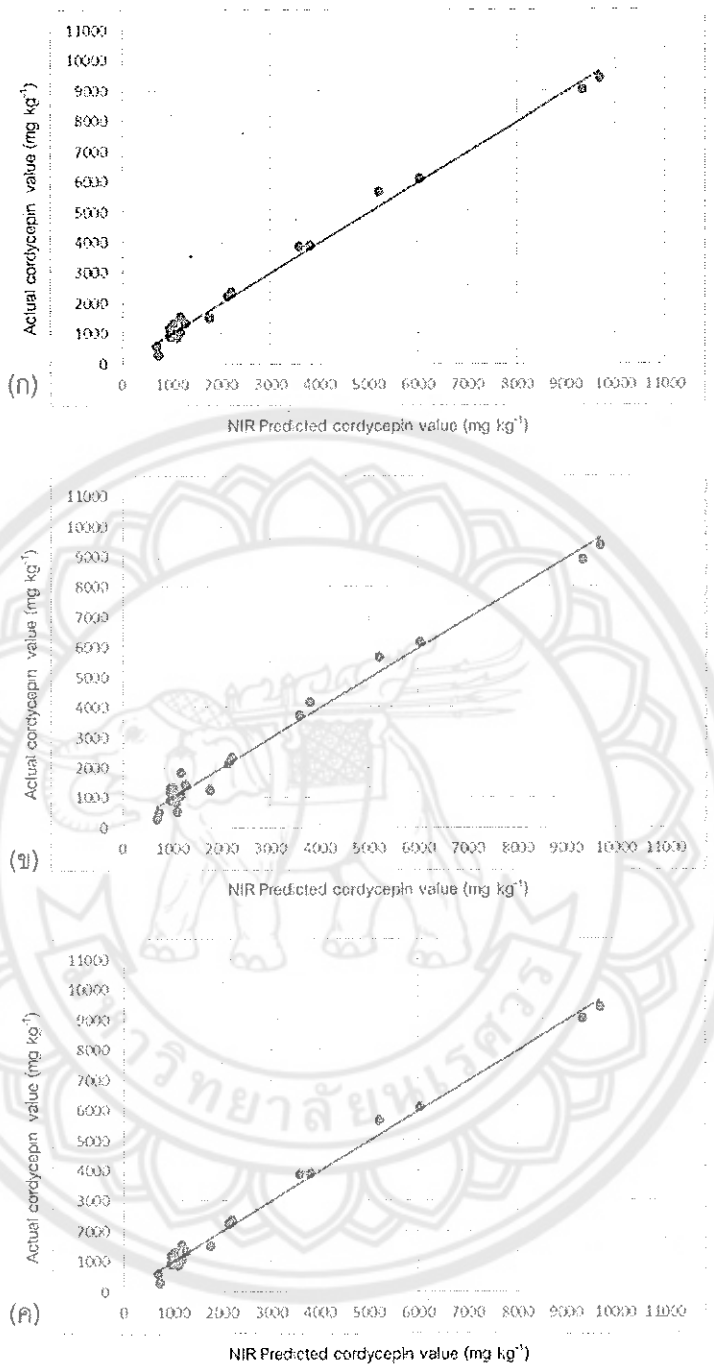
ภาพ 61 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



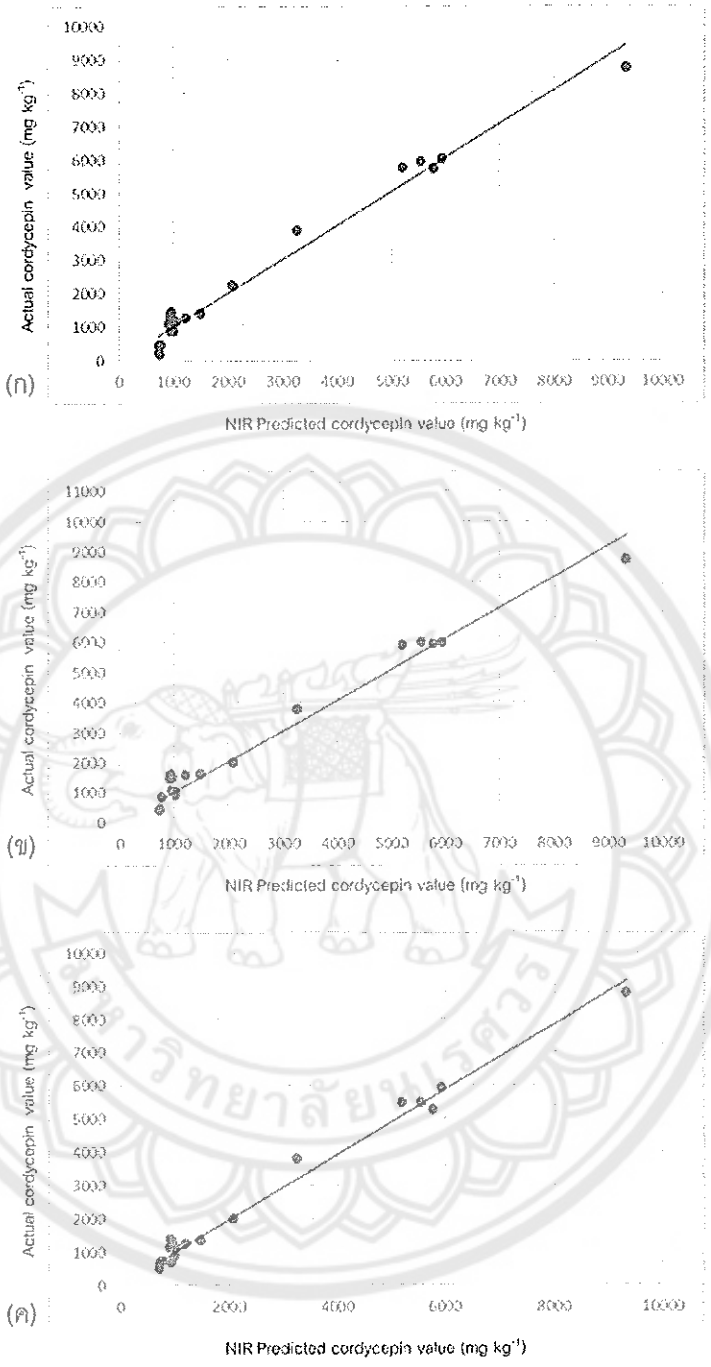
ภาพ 62 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



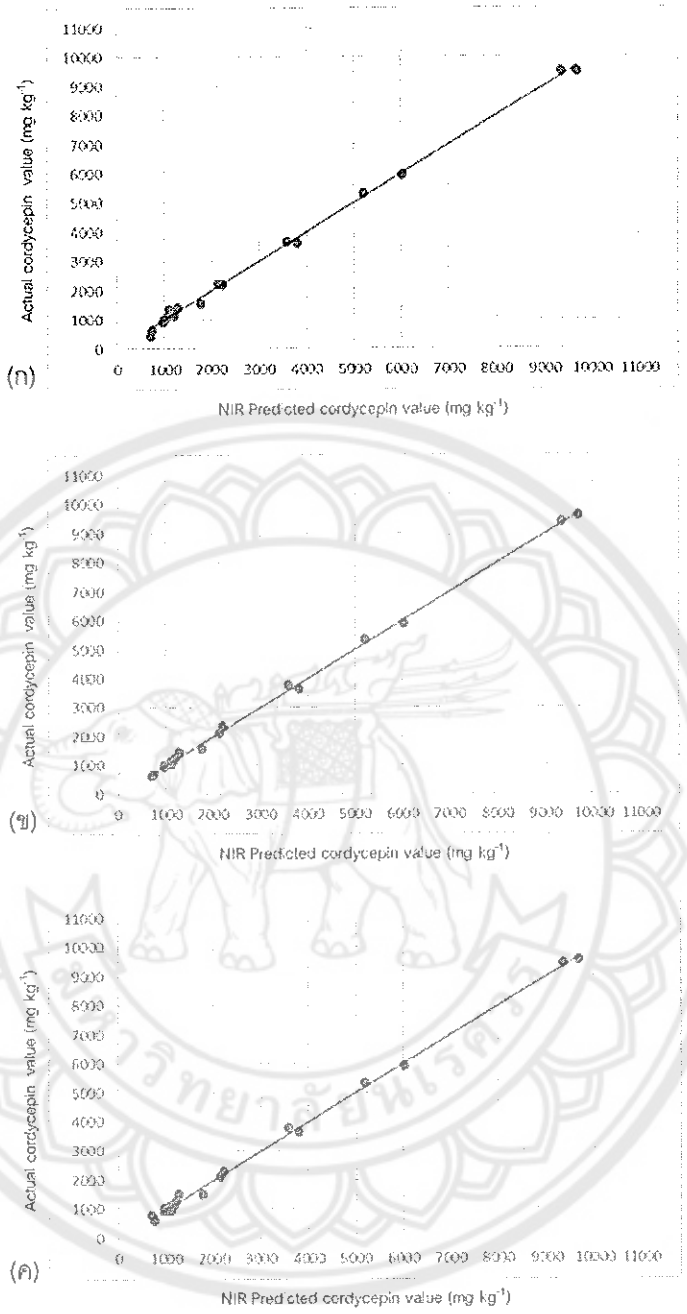
ภาพ 63 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



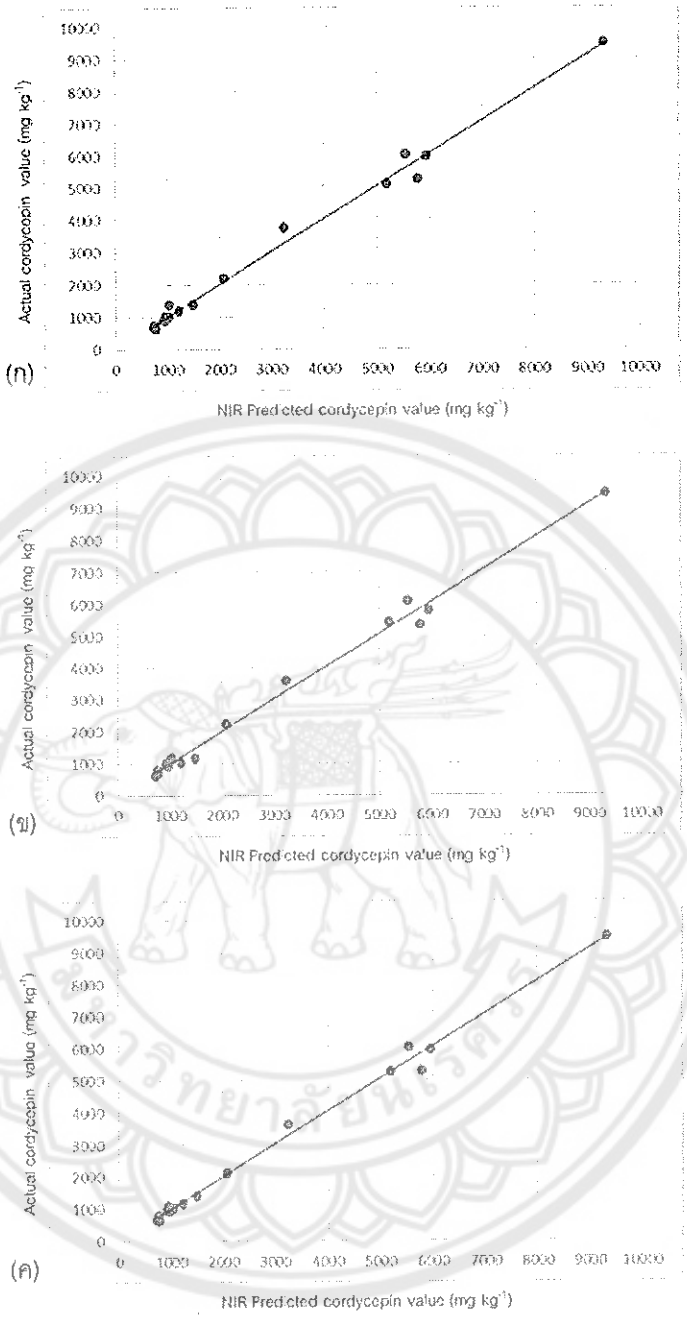
ภาพ 64 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกสดสับละเอียด**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



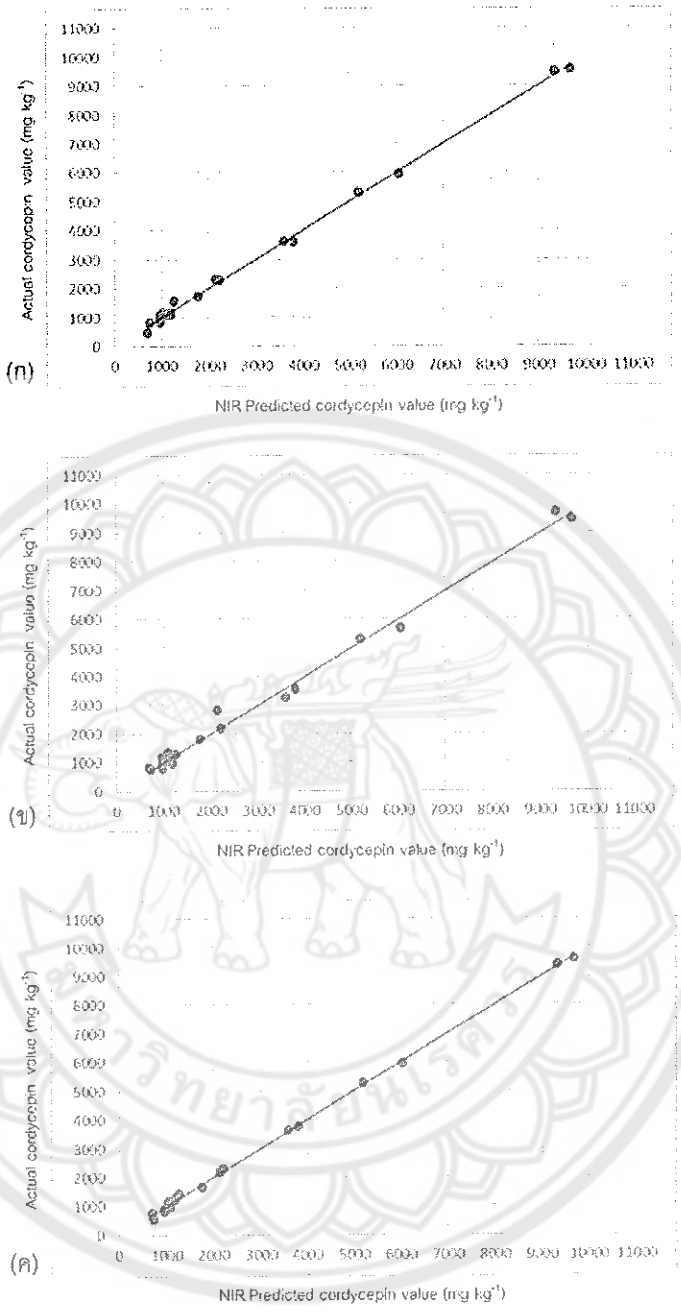
ภาพ 65 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



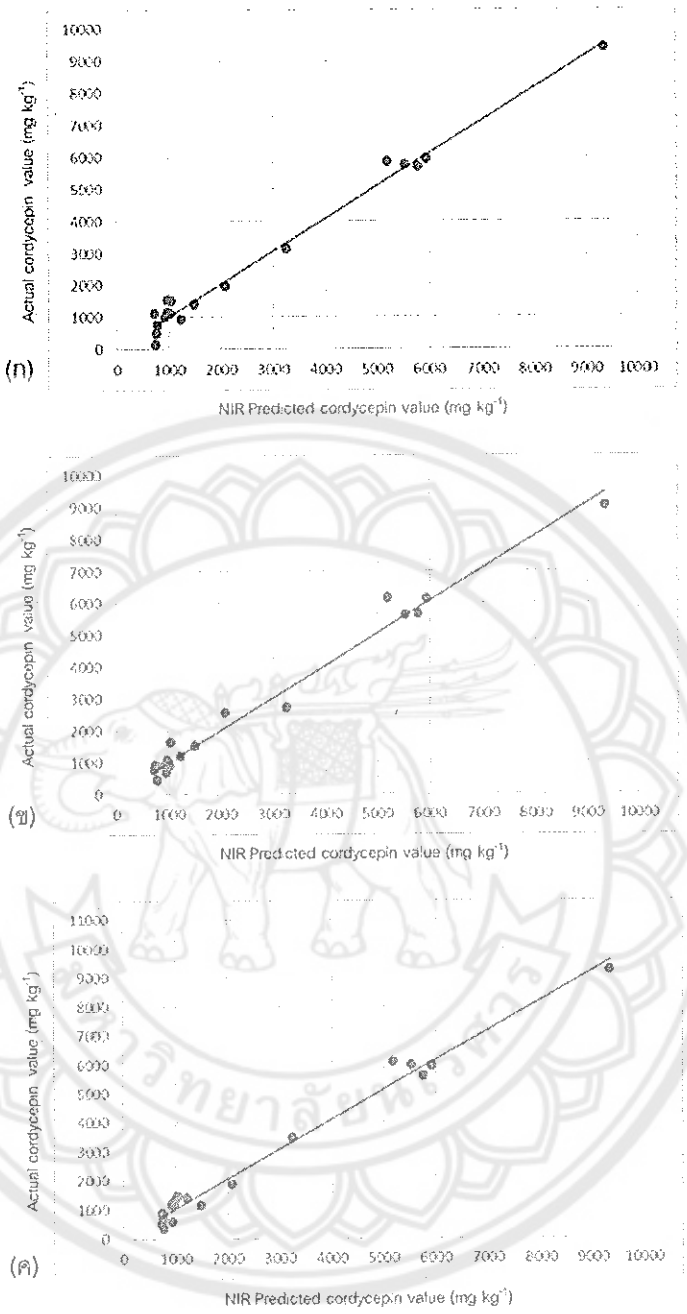
ภาพ 66 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบดอกอบแห้งที่บดเป็นผง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



ภาพ 67 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** calibration sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)



ภาพ 68 Scatter plot **ของข้อมูลอ้างอิง** (Y) **และข้อมูลทำนาย** (X) **กลุ่ม** validation sample set **สำหรับปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง**

หมายเหตุ: (ก) ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (no preprocessing) (ข) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี vector normalization (SNV) (ค) มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)

ตาราง 38 การทดสอบแบบจำลองในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ

Bioactive compound	Sample form of the fruiting bodies	Preprocessing method	No of PLS factors	Calibration set (n = 20)			Prediction set (n = 19)				
				R^2_c	SEC	RPD	R^2_p	RMSEP	Bias	RPD	SEP
Adenosine (mg kg^{-1})	Fresh fruiting bodies	No preprocess	8	0.98	19.61	7.74	0.85	48.40	-1.13	2.66	49.61
		Vector normalization	10	0.98	21.15	7.95	0.85	49.10	-5.74	2.64	49.86
		Constant offset elimination	9	0.98	16.94	9.40	0.91	38.10	-7.55	3.45	38.42
	Chopped fresh fruiting bodies	No preprocess	7	0.94	32.63	4.46	0.95	26.90	-8.57	5.04	27.50
		Vector normalization	8	0.98	18.81	8.07	0.93	33.99	3.71	3.83	34.43
		Constant offset elimination	8	0.98	19.19	7.92	0.94	30.80	-10.40	4.44	30.36
	Dried powder	No preprocess	9	0.96	31.88	5.14	0.92	35.2	0.12	3.66	36.12
		Vector normalization	7	0.92	38.44	3.76	0.93	32.60	-10.30	4.17	28.75
		Constant offset elimination	9	0.95	33.01	4.83	0.92	34.80	-3.50	3.72	35.56
	Dry extract system for infrared	No preprocess	6	0.86	74.44	2.70	0.86	46.60	-3.82	2.77	47.33
		Vector normalization	7	0.88	48.50	3.00	0.88	43.50	3.35	2.97	44.40
		Constant offset elimination	5	0.76	65.24	2.06	0.84	50.2	-1.43	2.56	51.56
Cordycepin (mg kg^{-1})	Fresh fruiting bodies	No preprocess	10	0.99	275.23	14.40	0.95	502.00	-76.1	4.96	512.87
		Vector normalization	9	0.99	331.66	11.40	0.97	386.00	86.30	6.54	386.83
		Constant offset elimination	7	0.97	528.49	6.57	0.95	533.00	-115.00	4.74	534.42

ตาราง 38 (ต่อ)

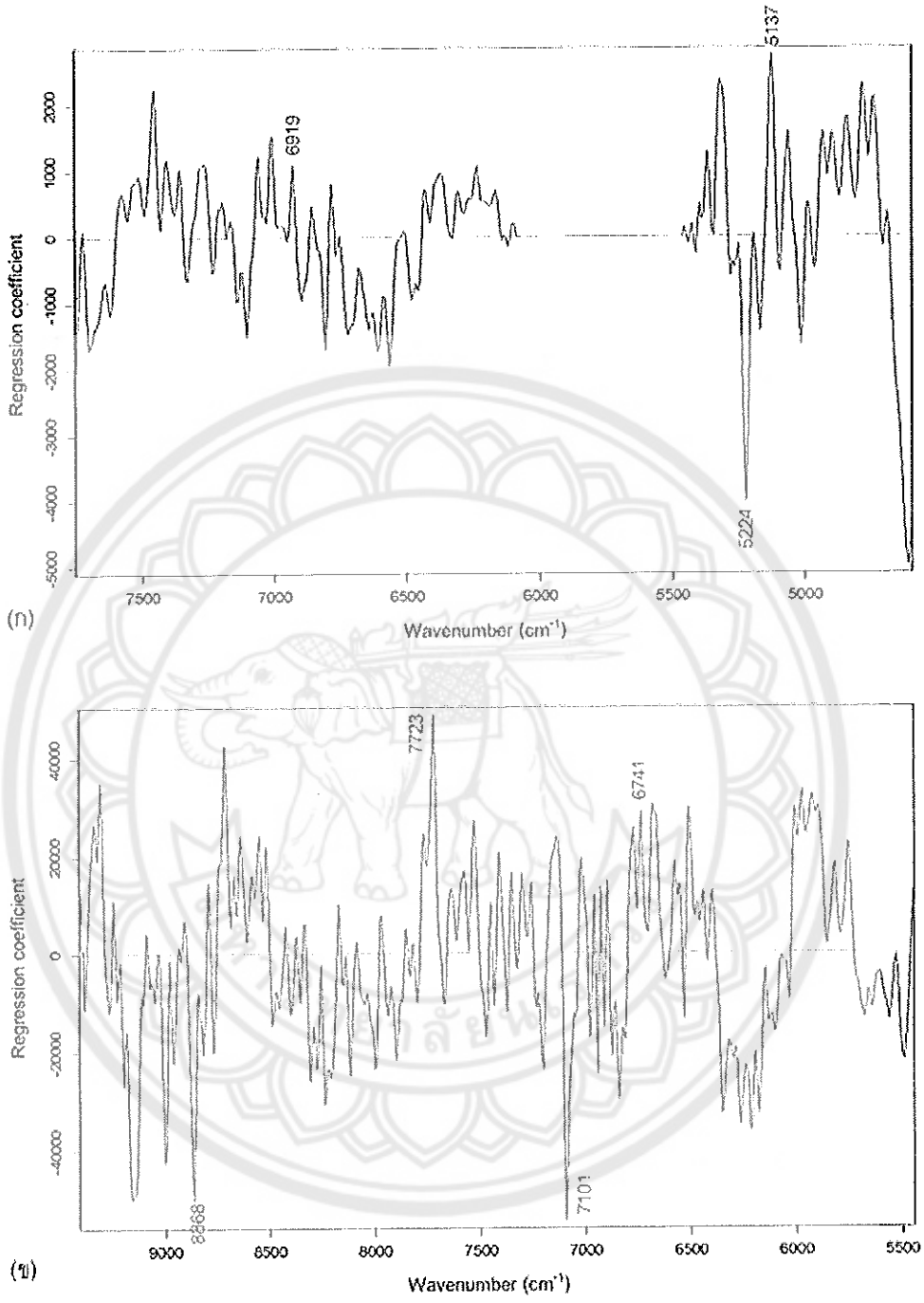
Bioactive compound	Sample form of the fruiting bodies	Preprocessing method	No of PLS factors	Calibration set (n = 20)			Prediction set (n = 19)				
				R^2_c	SEC	RPD	R^2_p	RMSEP	Bias	RPD	SEP
	Chopped fresh fruiting bodies	No preprocess	7	0.99	308.62	11.30	0.97	365.00	-36.60	6.78	356.39
		Vector normalization	8	0.98	455.58	7.96	0.97	397.00	-147.00	6.68	378.85
		Constant offset elimination	8	0.99	248.66	14.60	0.98	277.00	-1.05	8.90	283.69
	Dried powder	No preprocess	7	0.99	181.44	19.20	0.99	226.00	-28.10	11.00	230.31
		Vector normalization	10	0.99	158.23	25.40	0.99	218.00	-22.50	11.30	223.99
		Constant offset elimination	10	0.99	188.42	21.30	0.99	196.00	-29.30	12.70	198.78
	Dry extract system for infrared	No preprocess	9	0.99	185.30	20.50	0.98	308.00	-69.90	8.21	312.89
		Vector normalization	6	0.99	303.46	11.00	0.98	339.00	-66.90	7.40	313.92
		Constant offset elimination	9	0.99	142.68	26.70	0.98	337.00	-85.60	7.54	335.33

หมายเหตุ: PLS-factors: Number of partial least squares factors used to build the model in test set validation, (R^2_c = Determination coefficient in calibration, SEC = Standard error of calibration, R^2_p = Determination coefficient in prediction, RMSEP = Root mean square error of prediction, RPD = Ratio of prediction to deviation (RPD = SD/SEP), SEP = Standard error of prediction.

4. การทดสอบสมการกับกลุ่มตัวอย่างเพื่อคัดเลือกสมการที่ดีที่สุดในการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อนำสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างทั้ง 4 แบบ คือ ดอกสด ดอกสดสับละเอียด ดอกอบแห้งบดละเอียด และสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้วที่ผ่านการอบแห้ง มาทำการทดสอบความแม่นยำของสมการกับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองกลุ่มใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเตรียมเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกัน 4 แบบ แล้วนำไปวัดสเปกตรัมโดยใช้วิธีการเดียวกันกับการสร้างสมการ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร อะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC หลังจากนั้นทำการทดสอบความแม่นยำของสมการด้วยโปรแกรม OPUS version 7.2 (ประเทศเยอรมัน) นำค่าที่ทำนายได้มาเปรียบเทียบกับค่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC จากการทดลอง พบว่า สมการที่สามารถทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด คือ แบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) ของตัวอย่างที่เป็นเห็ดสดสับละเอียด โดยมีค่า SEP ต่ำที่สุด เท่ากับ 100.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า bias เท่ากับ 36.44 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตาราง 39 ส่วนสมการที่สามารถทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด คือ แบบจำลองที่สร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี COE ของตัวอย่างที่เป็นเห็ดสดสับละเอียดเช่นเดียวกัน โดยมีค่า SEP ต่ำที่สุด เท่ากับ 1,505.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า bias เท่ากับ 306.99 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตาราง 40 เมื่อพิจารณาค่า Regression coefficient จากสมการทั้ง 2 สมการดังกล่าว พบว่า เลขคลื่นหลักที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสมการทำนายสารอะดีโนซีน ได้แก่ 6919, 5224 และ 5137 cm^{-1} ส่วนเลขคลื่นหลักที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสมการทำนายคอร์ไดเซปินมีค่าใกล้เคียงกันกับเลขคลื่นของสารอะดีโนซีน ได้แก่ 8868, 7723, 7101 และ 6741 cm^{-1} ดังภาพ 69 (ก) และ (ข) ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบทางเคมีของสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อนำสมการที่ดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินทั้ง 2 สมการมาทดสอบค่าทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่า bias ค่า SEP และค่าความชัน (slope) ตามมาตรฐาน ISO12099 พบว่า สมการที่ทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินมีค่า bias น้อยกว่าค่า T_b ดังนั้น ค่า bias ของสมการดังกล่าวไม่แตกต่างไปจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับการวิเคราะห์ค่า SEP ของสมการทั้ง 2 สมการ พบว่า ค่า SEP มีค่าน้อยกว่าค่า T_{UE} แสดงให้เห็นว่า ค่า SEP มีค่าต่ำพอที่ยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนการทดสอบค่าความชัน พบว่า ค่า t_{obs} มีค่าน้อยกว่าค่า $t_{(1-\alpha/2)}$ แสดงให้เห็นว่า ค่าความชันของสมการทั้ง 2 สมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตาราง 41



ภาพ 69 Regression coefficient plots

หมายเหตุ: (ก) สมการทำนายสารอะดีโนซีนจากตัวอย่างเห็ดสดสับละเอียดที่ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม (ข) สมการทำนายสารคอร์ไดเซปินจากตัวอย่างเห็ดเห็ดสดสับละเอียดที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)

ตาราง 39 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC และผลการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนโดยวิธี NIR ด้วยสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ

Sample test	Adenosine concentration using the HPLC method (mg kg^{-1})	Adenosine concentration using NIR method (mg kg^{-1})			
		Fresh fruiting bodies using COE*	Chopped fresh fruiting bodies NP*	Dried powder using SNV*	Dry extract system for infrared using SNV
1	596.52	722.87	613.75	1,671.66	1,014.63
2	495.51	810.21	454.41	1,347.83	1,723.16
3	650.71	466.70	697.11	1,365.93	862.92
4	652.16	534.04	601.20	1,360.63	926.09
5	727.99	684.59	603.76	1,345.93	930.16
6	639.52	670.31	648.52	1,817.10	937.53
7	730.58	907.95	790.17	1,472.40	1,262.13
8	861.28	670.16	571.82	1,553.66	778.11
9	748.32	649.25	780.00	1,323.33	443.12
10	936.32	802.80	913.68	1,690.96	656.20
	SEL** = 36.19	SEP** = 141.62	SEP = 100.06	SEP = 193.36	SEP = 449.74
		Bias = 12.00	Bias = 36.44	Bias = -791.14	Bias = -249.47

หมายเหตุ: * NP = No preprocessing, SNV = Vector normalization, COE = Constant offset elimination

** SEP = Standard error of prediction, ** SEL = Standard error of the laboratory

ตาราง 40 การวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินด้วยวิธีมาตรฐาน HPLC และผลการทำนายปริมาณคอร์ไดเซปินโดยวิธี NIR ด้วยสมการที่ดีที่สุดของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ

Sample test	Cordycepin concentration using the HPLC method (mg kg^{-1})	Cordycepin concentration using NIR method (mg kg^{-1})			
		Fresh fruiting bodies using COE*	Chopped fresh fruiting bodies NP*	Dried powder using SNV*	Dry extract system for infrared using SNV
1	6,249.79	11,302.33	6,270.76	7,256.60	5,491.50
2	5,719.98	12,175.00	5,253.70	5,783.46	13,961.66
3	3,777.77	6,043.80	4,416.10	6,595.56	4,820.13
4	4,308.65	10,575.66	4,565.96	8,423.26	7,589.76
5	3,510.89	8,799.03	4,457.20	4,923.83	6,281.53
6	5,214.33	8,714.43	5,755.06	6,243.03	5,632.40
7	3,984.07	11,363.00	3,558.70	8,543.00	6,675.36
8	5,237.84	8,995.96	5,042.56	9,092.70	7,314.56
9	9,081.82	9,355.56	4,696.36	7,933.90	4,679.03
10	6,157.45	10,337.03	6,156.26	10,647.33	5,236.26
	SEL = 289.66	SEP = 5,571.44	SEP = 1,505.12	SEP = 6,004.99	SEP = 2,348.94
		Bias = 444.19	Bias = 306.99	Bias = -2,220.01	Bias = -1,143.96

หมายเหตุ: * NP = No preprocessing, SNV = Vector normalization, COE = Constant offset elimination

** SEP = Standard error of prediction, ** SEL = Standard error of the laboratory

ตาราง 41 การทดสอบค่าทางสถิติตามมาตรฐาน ISO12099 ของสมการที่ดีที่สุดในการทำนายสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน

Best equations	Parameters	Calculated value	Criterion	Results
For adenosine prediction:	Bias	-8.57 mg kg^{-1}	$T_b = \pm 13.27$	Pass
chopped fresh fruiting bodies	SEP	27.5 mg kg^{-1}	$T_{UE} = 52.20$	Pass
without preprocessing	t_{obs} for slope testing	0.40	$t_{(1-\alpha/2)} = 2.10$	Pass
For adenosine prediction:	Bias	-1.05 mg kg^{-1}	$T_b = \pm 136.95$	Pass
chopped fresh fruiting bodies	SEP	283.69 mg kg^{-1}	$T_{UE} = 406.31$	Pass
using COE method	t_{obs} for slope testing	1.10	$t_{(1-\alpha/2)} = 2.10$	Pass

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้มาจากฟาร์มเพาะเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง (CM1-CM6) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเดียวกัน พบว่า ให้ผลผลิตที่แตกต่างกัน ลักษณะคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้โดยส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกัน เช่น ลักษณะของดอกเห็ด ความแน่นเนื้อ ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (TSS) และสีดอก ในขณะที่สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดของแต่ละสายพันธุ์นั้นมีปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อหาความเหมือนหรือแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อเห็ดกลุ่มนี้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.163 ถึง 0.830 ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายพันธุ์ CM1 และ CM3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย 1 ได้แก่ สายพันธุ์ CM2 กลุ่มย่อย 2 ได้แก่ สายพันธุ์ CM4 และกลุ่มย่อย 3 ได้แก่ สายพันธุ์ CM5 และ CM6 โดยสายพันธุ์ CM5 และ CM6 มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด ส่วน CM2 และ CM3 มีความเหมือนทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

2. สูตรอาหาร M10 ที่ประกอบด้วย ข้าวสาร 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม ไข่ไก่ดิบ 10 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) 40 มิลลิลิตร เป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยให้ผลผลิตจำนวนดอกเฉลี่ย 101 ดอก ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 กรัม ให้น้ำหนักรวมเฉลี่ย 40.98 กรัม ให้ลักษณะของดอกเห็ดที่ยาวและอวบกว่าสูตรอาหารอื่นๆ ดอกเห็ดมีค่าความสว่าง (L*), ค่าสีเหลือง (b*) และค่าสีแดง (a*) เฉลี่ยเท่ากับ 37.43, 22.03 และ 50.6 ตามลำดับ มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ย 0.39 นิวตัน ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) มีค่าเฉลี่ย 13.16% มีปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ย 1,166.59 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 4,799.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และจากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในช่วงระยะเวลาประมาณ 7 สัปดาห์ หรือ 49 วัน ถึง 8 สัปดาห์ หรือ 56 วัน หลังจากหยอดเชื้อเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว โดยให้ผลผลิตน้ำหนักสดในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 โดยเฉลี่ย 41.77 และ 41.20 กรัม ต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 กรัม

3. การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 5°C มีความเหมาะสมในการช่วยรักษาคุณภาพสีของดอกเห็ดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30°C ในขณะที่การเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 30°C มีความเหมาะสมในการช่วยป้องกันการดูดซับความชื้น ค่า water activity (a_w) กิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และเอนไซม์ catalase (CAT) ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 5°C ส่วนการเปลี่ยนแปลงด้านอื่นๆ ได้แก่ ค่าความแน่นเนื้อ ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน พบว่า การเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C สามารถช่วยรักษาคุณสมบัติเหล่านี้ได้ไม่แตกต่างกัน

4. การเก็บรักษาหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบเส้นใยโดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกันจะทำให้เชื้อเห็ดมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพได้แตกต่างกัน โดยการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C หรือ 45°C เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับหัวเชื้อเริ่มต้นมากที่สุด

5. เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) มีประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ โดยแบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม ในขณะที่แบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี constant offset elimination (COE)

อภิปรายผล

การทดลองที่ 1 ตอนที่ 1

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่พบโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage หรือระยะ teleomorph) ที่สร้างดอกเห็ด (stroma) หรือ fruiting body ที่มีก้านดอก (stalk) ที่มีขนาดและคุณภาพแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้บอกถึงความแตกต่างของเห็ดชนิดนี้กับสายพันธุ์อื่นได้ ซึ่งสามารถจำแนกได้เบื้องต้นโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้รับมาจากฟาร์มเพาะเห็ดเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยจำนวน 6 แหล่ง (6 สายพันธุ์) ในด้านการให้ผลผลิต คุณสมบัติทางกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งของ

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากผลการศึกษา พบว่า แต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตที่เป็นจำนวนดอกและน้ำหนักสดในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกัน ในด้านลักษณะรูปร่างของดอกเห็ด หรือ สโตรมา พบว่า มีความแตกต่างกันในบางสายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ดอกจะมีลักษณะผอมยาว ปลายมนกลมโดยส่วนใหญ่ ได้แก่ CM1, CM3, CM5 และ CM6 ส่วนสายพันธุ์ CM4 ดอกมีลักษณะอ้วนและปลายแหลม ในขณะที่สายพันธุ์ CM2 มีการเจริญของเส้นใยแต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นดอก ค่าความแน่นเนื้อของก้านดอก พบว่า จะมีค่าสูงในดอกที่มีลักษณะอวบอ้วน ส่วนสีของดอกนั้นเมื่อมองด้วยตาเปล่าแล้วไม่มีความแตกต่างกันมากนัก คือให้สีเหลืองถึงส้ม ในขณะที่เส้นใยของสายพันธุ์ CM2 ให้สีเหลืองอ่อน ในด้านการผลิตสารอะดี-โนซีนและคอร์ไดเซปินนั้น พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองของแต่ละสายพันธุ์มีการผลิตสารทั้ง 2 ชนิดนี้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยเส้นใยของสายพันธุ์ CM2 มีปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำสุด แต่ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุด จากผลการทดลองดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu et al. (2011, pp. 189-195) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสกุล *Cordyceps* จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่า ดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นั้นมีการสร้างดอกหลายลักษณะทั้งรูปร่างผอม ยาว ขนาดตั้งแต่ 2-12 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1-4 มิลลิเมตร บางชนิดปลายดอกอาจมีลักษณะปลายแฉก หรือม้วนงอลง แต่บางชนิดไม่มีการสร้างดอก เป็นต้น ธัญญาทะพิงค์แก (2555ก, น. 113-117) รายงานว่าสามารถคัดแยกสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*; CMRU) จากธรรมชาติ ได้จำนวน 15 ชนิด (CMRU1-CMRU15) ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารเหลวและบนอาหารแข็งที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสายพันธุ์ CMRU ทั้ง 15 ชนิด ยังมีความแปรปรวนสูงในด้านความสามารถในการผลิตสารคอร์ไดเซปิน คือ ประมาณ 2,000-8,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่คัดแยก และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU1-CMRU15 พบว่ามีความแตกต่างกันในด้านขนาด รูปร่าง สีของดอกเห็ด การเจริญเติบโตของเส้นใย บางสายพันธุ์ไม่มีการพัฒนาเป็นดอกเห็ด และบางสายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้มในระยะดอกเห็ด โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Stensrud, et al. (2005, pp. 41-56; Chen, et al., 2004, pp. 153-158) รายงานว่าเชื้อรา *C. militaris* ที่พบในพื้นที่ต่างกันอาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมและสามารถผลิตสารคอร์ไดเซปินได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามในการศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกนี้ จะยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ศึกษาเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือไม่ เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ได้รับจากแหล่งที่ทำการเพาะเลี้ยงต่างกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสำคัญหลายประการที่มีผลต่อการเจริญของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ คุณภาพของสายพันธุ์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมทั้งปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และแสง ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น จำเป็นต้องทำการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การทดลองที่ 1 ตอนที่ 2

จากการศึกษาตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ universal primer จำนวน 25 ไพรเมอร์ พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (PCR product) รวมทั้งหมด 350 แถบ (loci) โดยไพรเมอร์ชนิด OPA-03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอมากที่สุด จำนวน 36 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์ชนิด OPD-03 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ อาจเป็นไปได้ว่าบริเวณที่เป็นเบสซ้ำกับไพรเมอร์ชนิดนี้พบได้ค่อนข้างน้อยกับเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ จากผลการการทดลองแสดงให้เห็นว่า 1) ไพรเมอร์ชนิด OPA-10, OPF-16, OPG-10 และ OPJ-14 มีศักยภาพในการระบุเอกลักษณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM2 2) ไพรเมอร์ชนิด OPA-17 มีศักยภาพในการระบุเอกลักษณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM1 และ CM3 3) ไพรเมอร์ชนิด OPC-01 มีศักยภาพในการระบุเอกลักษณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM5 และ CM6 4) ไพรเมอร์ชนิด OPD-06 และ OPE-13 มีศักยภาพในการระบุเอกลักษณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM3 และ 5) ไพรเมอร์ชนิด OPT-16 มีศักยภาพในการระบุเอกลักษณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CM3 และ CM4

ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD แบบข่มสมบูรณ์ (dominant marker) โดยเป็นการวิเคราะห์ความแตกต่างของจีโนไทป์ในตำแหน่งไม่จำเพาะแต่กระจายทั่วจีโนม ดังนั้นจำนวนแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีจำนวนมาก (multiple dominant marker) ซึ่งเหมาะสำหรับการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทราบข้อมูลทางพันธุกรรม (Bhagyawant, 2016, pp. 1-9) โดยผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD marker มีศักยภาพสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wen et al. (2012, pp. 5215-5221) พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่สุ่มเก็บจากจังหวัด Sichuan ในประเทศจีนจำนวน 6 ไอโซเลต มีความหลายทางพันธุกรรมสูง และให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Mei et al. (2014, pp. 20219-20229) ที่รายงานความสำเร็จในการใช้เครื่องหมาย RAPD สำหรับจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma* sp. นอกจากนี้ชนิดของไพรเมอร์จำนวน 25 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังให้

ผลเป็นไปตามงานวิจัยของ TingChi et al. (2012, pp. 5215-5221) ที่ได้ระบุว่า ชนิดของไพรเมอร์ทั้ง 25 ชนิดดังกล่าว สามารถจำแนกชนิดเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองได้โดยใช้เครื่องหมาย RAPD

จากการนำข้อมูล banding score ไปวิเคราะห์ Phylogenetic tree เพื่อประเมินความเหมือนหรือแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป FreeTree ร่วมกับ โปรแกรม TreeView พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.163 ถึง 0.830 คิดเป็น 16.36-83.09% ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลต CM2, CM4, CM5 และ CM6 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลต CM1 และ CM3 ดังภาพที่ 21 โดยสายพันธุ์ CM5 และ CM6 มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คิดเป็น 83.09% ส่วน CM2 และ CM3 มีความเหมือนทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คิดเป็น 16.36% จากรายงานของ Wen et al. (2012, pp. 5215-5221) พบว่า ระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 6 ไอโซเลต ที่สุ่มเก็บจากจังหวัด Sichuan ในประเทศจีน ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วงระหว่าง 0.2384-0.4770 และให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Yuan et al. (2015, pp. 126-131) ที่ได้รายงานว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 สายพันธุ์ที่สุ่มเก็บในประเทศจีนมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมอาจเนื่องมาจากตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอาจถูกไอโซเลตมาจากตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งที่แตกต่างกัน แต่ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Wang et al. (2007, pp. 147-155) ที่ได้รายงานว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่ได้ผันแปรตามแหล่งที่พบ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้กับผลความแตกต่างของสายพันธุ์ในด้านผลผลิต คุณสมบัติทางกายภาพของดอก และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สายพันธุ์ CM2 ไม่มีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด เส้นใยมีสีเหลืองอ่อน ปริมาณสารอะดีโนซีนต่ำในขณะที่ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า สายพันธุ์ CM2 มีไพรเมอร์จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-10, OPF-16, OPG-10 และ OPJ-14 ที่แสดงเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์นี้ นับว่ามีจำนวนไพรเมอร์มากที่สุดเมื่อเทียบกับไพรเมอร์สายพันธุ์อื่นๆ แสดงให้เห็นว่า เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ CM2 มีพันธุกรรมที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่า สายพันธุ์ CM2 มีพันธุกรรมที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ สูงสุด

การทดลองที่ 2 ตอนที่ 1

จากผลการเจริญของเส้นใยและการพัฒนาของเส้นใยไปเป็นตุ่มดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารที่แตกต่างกันจำนวน 17 สูตร พบว่า สูตรอาหาร M10 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 10 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 40 มิลลิลิตร), M11 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 20 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) และ M12 (ประกอบด้วย ข้าว 50 กรัม ไข่ดิบ 30 มิลลิลิตร ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 20 มิลลิลิตร) เป็นสูตรอาหารที่ทำให้เส้นใยเจริญเต็มอาหารเพาะและพัฒนาไปเป็นตุ่มดอกใช้เวลาใกล้เคียงกัน ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 3 สูตรนี้ประกอบไปด้วยวัตถุดิบชนิดเดียวกัน คือ ข้าว ดักแด้ไหม ไข่ไก่ และอาหารเหลว PDB แต่ปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละสูตร และเมื่อเปรียบเทียบผลการเจริญของเส้นใยทั้ง 3 สูตรนี้กับสูตรอาหาร control พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสูตรอาหาร control ใช้ระยะเวลาในการเจริญของเส้นใยนานกว่า อาจเนื่องมาจากสูตรอาหาร control ประกอบด้วยวัตถุดิบหลักๆ เพียง 2 ชนิด คือ อาหารเหลว PDB และข้าว จึงทำให้มีปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตน้อยกว่าสูตรอาหารอื่นๆ เส้นใยจึงเจริญเติบโตได้ช้ากว่า อย่างไรก็ตามเมื่อมีการใส่วัตถุดิบที่เป็นดักแด้ไหม หรือไข่ ในอัตราส่วนต่างๆ ตามแต่ละสูตร พบว่าเส้นใยมีการเจริญเต็มอาหารเพาะเร็วขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสูตรอาหารที่มีการเติมดักแด้ไหมร่วมกับไข่ หรือเติมเพียงดักแด้ไหมหรือไข่อย่างใดอย่างหนึ่งเสริม จะทำให้เส้นใยมีการเจริญเต็มอาหารเพาะและพัฒนาเป็นตุ่มดอกได้เร็วขึ้น อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบดังกล่าวอุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris)* โดยไข่ไก่ 1 ฟอง (50 กรัม) ให้พลังงาน 80 กิโลแคลอรี ประกอบไปด้วย โปรตีน 7 กรัม, ไขมัน 6 กรัม และให้วิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญ เช่น แคลเซียม, ฟอสฟอรัส, วิตามินเอ, วิตามิน (1, 2, 3, 6 และ 12), เหล็ก และเลซิทิน (lecithin) เป็นต้น (พูนศรี เลิศลักขณวงศ์, 2548) ส่วนดักแด้ไหมในน้ำหนักสด 100 กรัม ให้พลังงาน 152 กิโลแคลอรี ประกอบด้วย โปรตีน 14.7 กรัม, ไขมัน 8.3 กรัม และคาร์โบไฮเดรต 4.7 กรัม (นันทยา จงใจเทศ และคณะ, 2549) นอกจากนี้ยังพบว่า สูตรอาหารที่มีการเติมน้ำนมเสริมเพียงอย่างเดียวจะทำให้การเจริญของเส้นใยช้ากว่าสูตรอาหารที่เติมไข่หรือดักแด้ไหม ถึงแม้ว่าน้ำนมจะอุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นเช่นเดียวกันกับดักแด้ไหมและไข่ โดยกองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขรายงานว่า นมโค 100 กรัม ให้ไขมัน 3.2 กรัม คาร์โบไฮเดรต 4.9 กรัม, โปรตีน 3.4 กรัม และให้วิตามินและแร่ธาตุที่สำคัญ เช่น แคลเซียม, ฟอสฟอรัส, เหล็ก, วิตามินเอ, วิตามินบี (1, 2), วิตามินซี และไนอาซีน (ไทยเกษตรศาสตร์, 2014) แต่อาจเป็นไปได้ว่าในธรรมชาติของเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยปกติจะเจริญเติบโตในตัวหนอนหรือแมลงที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นจึงทำให้มีการเจริญเติบโตจากแหล่งอาหารที่ประกอบด้วยดักแด้ไหมและไข่ดีกว่าน้ำนม ซึ่งมี

ความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim et al. (2010, pp. 133-136) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่ออาหารสังเคราะห์ในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ *Cordyceps cardinalis* พบว่า การเพิ่มดักแด้ไหมเข้าไปประมาณ 10-20 กรัม ในธัญพืชที่เป็นข้าวกล้องในปริมาณ 50-60 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร จะทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น และสอดคล้องกับงานวิจัยของ รัฐพล ศรประเสริฐ และคณะ (2559) ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ด้วยเมล็ดธัญพืชและแมลงในท้องถิ่น พบว่า สูตรอาหารดักแด้ไหม และสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม PDB มีอายุการเจริญของเส้นใยและการเกิดตุ่มดอกเร็วที่สุด

เมื่อพิจารณาผลผลิตที่เป็นจำนวนดอก น้ำหนักสด ความยาวของดอก และความสมบูรณ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า การเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร M10 และ M14 (ประกอบด้วยข้าว 50 กรัม ดักแด้ไหม 30 กรัม น้ำนม 20 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 30 มิลลิลิตร) มีจำนวนดอกเห็ดมากที่สุดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 101 ดอก แต่เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดแล้วพบว่า น้ำหนักสดของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร M10 มีปริมาณมากกว่าสูตรอาหาร M14 ซึ่งมีสาเหตุมาจากขนาดของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้บนสูตรอาหาร M10 มีความยาวและความสมบูรณ์ของดอกมากกว่า สำหรับสูตรอาหาร control ให้ผลผลิตที่เป็นจำนวนดอกและน้ำหนักสดน้อยที่สุด เนื่องจากมีปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตน้อยกว่าสูตรอาหารอื่นๆ สำหรับค่าความแน่นเนื้อของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า มีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์ของดอก โดยดอกเห็ดที่มีลักษณะอวบมากจะมีค่าความแน่นเนื้อสูง ซึ่งส่วนใหญ่พบในตัวอย่างของดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M10 สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) และค่าสีของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่วัดได้ในทุกสูตรอาหาร โดยภาพรวม พบว่า ให้ผลในระดับที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่แตกต่างเหล่านี้มีผลต่อการเกิดรสชาติความหวานและค่าสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่แตกต่างกันมากนัก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ 2 ชนิด คือ สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงได้จากสูตรอาหาร M4 (ประกอบด้วยข้าว 50 กรัม, น้ำนม 10 มิลลิลิตร และอาหารเหลว PDB 40 มิลลิลิตร) และ M16 (ประกอบด้วยข้าว 50 กรัม, ดักแด้ไหม 30 กรัม และอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร) มีปริมาณสารอะดีโนซินสูงที่สุดไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 1,259.81 mg kg^{-1} และ 1,214.82 mg kg^{-1} ตามลำดับ รองลงมาคือสูตรอาหาร M10 มีค่าเท่ากับ 1,166.59 mg kg^{-1} ส่วนปริมาณสารคอร์ไดเซปินนั้น พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M10 มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุด รองลงมาคือสูตรอาหาร M16 จะเห็นได้ว่า

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิด ในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร M10 และสูตรอาหาร M16 ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรนี้ประกอบด้วยวัตถุดิบที่คล้ายกัน ยกเว้นไข่ไก่ที่ไม่ได้ใส่ในสูตรอาหาร M16 แต่เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตโดยรวมจะเห็นว่า อาหารสูตร M10 ให้ผลผลิตของดอกเห็ดและให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสูตรอาหาร M16 ดังนั้นเมื่อพิจารณาขั้นต้นจากผลผลิตที่ได้ และพิจารณาในด้านการผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน จะเห็นได้ว่าสูตรอาหาร M10 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในระดับเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้วัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก มีรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น Huang et al. (2009, pp. 957-961) รายงานว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเมล็ดธัญพืชข้าวให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินสูงกว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บมาจากธรรมชาติ โดยมีปริมาณสารอะดีโนซีนเท่ากับ 2.70 mg g^{-1} และ 3.41 mg g^{-1} ตามลำดับ ธัญญา ทะพิงค์แก และคณะ (2557) รายงานว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ CMRU ที่เพาะเลี้ยงในธัญพืชข้าวขาว ผสมข้าวโพดบด ซูโครส และวิตามินบี 1 เป็นเวลา 56 วัน จะให้ปริมาณอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินสูงสุดเฉลี่ย 888.70 และ 8,243.30 mg kg^{-1} ตามลำดับ รัฐพล ศรประเสริฐ และคณะ (2559) รายงานว่าดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในแมงกระชอนและผสมอาหารเหลว PDB ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินสูงสุดเฉลี่ย 1,567.30 mg kg^{-1} และ 2,081.70 mg kg^{-1} ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินที่มีอยู่ในดอกเห็ดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความแข็งแรงของสายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมถึงขั้นตอนวิธีการการสกัดและเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์ และอื่นๆ ดังนั้นจึงยากที่จะนำมาเปรียบเทียบกัน

การทดลองที่ 2 ตอนที่ 2

เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในปัจจุบันหาได้ยากและมีราคาแพง อีกทั้งในวงจรชีวิตตามธรรมชาติของเห็ดถั่งเช่าจะใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่นานมาก จึงเป็นเรื่องยากที่จะนำเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญเติบโตในธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมยาและอาหารเสริม การเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จึงเป็นที่นิยมมากขึ้นในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นและให้ผลผลิตสูง โดยปกติการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์จะใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 65-70 วัน จึงทำการเก็บเกี่ยว จากการศึกษาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในการทดลองตอนที่ 1 ทำให้ทราบว่าสูตรอาหาร M10 มีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองอีกครั้งในสูตรอาหาร M10 และศึกษาการเปลี่ยนแปลงใน

ด้านการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่า น้ำหนักสดของดอก ความยาวดอก และค่า TSS ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 7 ถึงสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสี พบว่าค่าความสว่าง (L*) มีค่าลงลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากรงควัตถุในเซลล์เห็ดถั่งเช่าสีทองจะถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นเมื่อได้รับแสง โดย Shrestha et al. (2006, pp. 83-91) รายงานว่า แสงเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อความแน่นเนื้อและสีผิวของเห็ดถั่งเช่าสีทอง นอกจากนี้งานวิจัยของของ Hong et al. (2010, pp. 128-132) ได้รายงานว่า เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารข้าวจะถูกชักนำให้พัฒนาไปเป็นดอกเห็ดหรือสโตรมาเมื่อได้รับแสงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 500-1,000 ลักซ์ ซึ่งจากรายงานทั้งหมดที่กล่าวมาให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการวิจัยในครั้งนี้ ถึงแม้จะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกันก็ตาม

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสูตรอาหาร M10 เป็นระยะเวลา 49 วัน ถึง 56 วัน เป็นช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเกี่ยว ซึ่งนอกจากจะทำให้การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ผลผลิตดีและได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงแล้ว ยังสามารถช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงลงได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดิม ดังนั้นจึงทำให้เกิดผลดีในด้านการลดต้นทุนในกระบวนการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในระดับเชิงพาณิชย์ได้

การทดลองที่ 3

ในการศึกษาทางด้านการเก็บรักษาเห็ดเศรษฐกิจหลังการเก็บเกี่ยวที่เคยมีรายงานส่วนมากจะทำการศึกษาในตัวอย่างที่เป็นเห็ดสดในสภาพดัดแปลงบรรยากาศเพื่อหาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาให้เหมาะสมและคงคุณภาพให้มากที่สุด ในขณะที่การศึกษาการเก็บรักษาตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการอบแห้งมีการศึกษาและรายงานค่อนข้างน้อย งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการอบแห้งแล้วในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กล่องพลาสติกถนอมอาหาร ถุงฟอยด์แบบซิปล็อค และถุงฟิล์มพลาสติกชนิด PA/LDPE แบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 5°C และอุณหภูมิห้อง 30 (±5)°C เพื่อพิจารณาว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเห็ดทั้งในด้านคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งค่าต่างๆ เหล่านี้เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดราคาสินค้าหรือผลิตภัณฑ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สำหรับค่าการดูดกลับความชื้นถูกคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) จากการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างหลังการเก็บรักษาเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนเก็บรักษา จากการทดลอง พบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลับความชื้นของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C โดยภาพรวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องจนถึงเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษา โดยจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C มีค่าการดูดกลับความชื้นสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C อาจเนื่องมาจากความชื้นในตู้เย็นที่อาจส่งผลกระทบต่อตัวอย่างในระหว่างเก็บรักษา หรืออาจเกิดจากผลกระทบจากปฏิกิริยาการควบแน่นในระหว่างการวัดผล โดยเมื่อนำตัวอย่างที่เก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำออกมาวัดผลในอุณหภูมิห้องที่สูงกว่าจึงทำให้เกิดการควบแน่นซึ่งทำให้มีไอน้ำหรือความชื้นที่อยู่รอบๆ มาเกาะอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ค่าการดูดกลับความชื้นที่คำนวณได้จึงอาจสูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามจากการวัดน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิทั้ง 2 สภาวะ พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนการเก็บรักษา โดยเมื่อพิจารณาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C พบว่า ค่าการดูดกลับความชื้นของตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า บรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีคุณภาพในการป้องกันความชื้นได้ดีไม่แตกต่างกัน ดังนั้นภาชนะบรรจุภัณฑ์แต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้จึงมีอัตราการซึมผ่านไอน้ำอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน โดยมีค่าประมาณ 4-6 g/m^2 .24 hr (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, หน้า 87) มีรายงานเกี่ยวกับการใช้บรรจุภัณฑ์ที่เป็นถุงอะลูมิเนียมฟอยด์เก็บรักษาผลิตภัณฑ์เห็ดนางรมอบแห้งโดย Jayathunge, & Illeperuma (2001, pp. 69-77) ได้รายงานว่า การเก็บรักษาเห็ดนางรมอบแห้งในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ที่อุณหภูมิ 27±2°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 82±3% เป็นเวลา 9 เดือน สามารถป้องกันความชื้นได้ดีกว่าวัสดุชนิดอื่น

สำหรับ ค่า water activity (a_w) เป็นค่าที่แสดงระดับพลังงานของน้ำที่อยู่ในอาหาร มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษา การเสื่อมเสีย และความปลอดภัยของอาหาร เนื่องจาก ค่า a_w ของอาหารเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา (Gustavo et al., 2007) จากผลการทดลอง พบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่า a_w ในเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลับความชื้น โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดอายุการเก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่ใช้ในเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C จะทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองแห้งมีค่า a_w เพิ่มขึ้นน้อยกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 5°C โดยการเก็บรักษาในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อคทำให้ที่อุณหภูมิ 30°C ทำให้ ค่า a_w ของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุด

อย่างไรก็ตามค่า a_w ของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าที่ถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C ที่วัดได้ในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษายังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน โดยอาหารแห้งที่มีความชื้นต่ำกว่า 15% จะต้องมีค่า a_w ที่ต่ำกว่า 0.6 จึงจะปลอดภัยต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (Frank, & Heather, 1992) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C พบว่า มีค่า a_w สูงเกินมาตรฐานของอาหารแห้งที่กำหนดไว้ ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการวิจัยของ สุพัตรา เปี่ยมวารี และคณะ (2554) ที่ได้ศึกษาการเก็บรักษาเห็ดเป๋าฮื้อแห้งในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิด คือถุงอะลูมิเนียมฟอยด์และถุงฟิล์ม โพลีเอทิลีน (PE) ใน 2 สภาวะการเก็บรักษา ซึ่งประกอบด้วยสภาวะแบบสุญญากาศและแบบไม่สุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง (28-32°C) เป็นเวลา 12 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์แบบสุญญากาศและแบบไม่สุญญากาศ ให้ค่า a_w เท่ากับ 0.40 และตรวจไม่พบจุลินทรีย์ปนเปื้อน ส่วนการเก็บรักษาในถุงฟิล์มโพลีเอทิลีน (PE) แบบสุญญากาศและแบบไม่สุญญากาศให้ค่า a_w ระหว่าง 0.50-0.64 และให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Jayathunge, & Illeperuma (2001, pp. 69-77) ที่ได้รายงานว่า การอบแห้งเห็ดนางรม (*Pleurotus* spp.) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จะสามารถลดค่า a_w จาก 0.84 ให้เหลือ 0.56 ทำให้สามารถเก็บรักษาเห็ดนางรมได้นานขึ้นและคงคุณภาพทางเคมีกายภาพของเห็ดได้ดี

สำหรับค่าความแน่นเนื้อเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่แสดงว่าตัวอย่างมีค่าการดูดกลับความชื้นมากน้อยเพียงใดในระหว่างการเก็บรักษา และเป็นตัวบ่งชี้ในด้านการเสื่อมสภาพของเซลล์ได้ จากการทดลองพบว่า ค่าความแน่นเนื้อมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดอายุการเก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง โดยมีความแปรผันโดยตรงกับการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลับความชื้นและค่า a_w กล่าวคือ เมื่อค่าการดูดกลับความชื้นและค่า a_w มากขึ้น ค่าความแน่นเนื้อของเห็ดถั่งเช่าอบแห้งจะลดลง ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่ถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C เป็นเวลา 12 เดือน มีค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องและสัมพันธ์กันกับผลการทดสอบค่าการดูดกลับความชื้นและค่า a_w ตามที่ได้อธิบายไว้แล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ แล้วพบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองที่วางไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 เดือน ให้ค่าความแน่นเนื้อต่ำที่สุด แสดงให้เห็นว่า ได้รับความชื้นและเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์มากที่สุด

สีเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อราคาของผลิตภัณฑ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยปกติเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีสีเหลือง หรือเหลืองเข้ม (Mains, 1958, pp. 169-222) เมื่ออบแห้งแล้วก็จะคงสภาพสีเดิมในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงค่าสี ได้แก่ ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) ค่าสีเหลือง (b*) และค่า Hue angle (H°) ซึ่งพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 °C ในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ทำให้ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งมีการเปลี่ยนแปลงค่า L*, a* และ ค่า b* น้อยกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 30 °C โดยการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในกล่องพลาสติกถนอมอาหาร และถุงฟอยด์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 5 °C ทำให้ค่า b* เปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุด เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยรักษาสภาพโครงสร้างทางเคมีของเม็ดสีหรือรงควัตถุต่างๆ ของดอกเห็ดได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง ในขณะที่เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อดูด้วยตาเปล่าแล้วจะเห็นว่ามีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นเป็นโทนสีแดงมากขึ้นเมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน โดยจะสังเกตได้ชัดเจนมากในตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C มีการเปลี่ยนแปลงสีไปอย่างชัดเจนเมื่อมองด้วยตาเปล่า โดยมีสีเข้มและคล้ำมากกว่าสภาวะอื่นๆ ซึ่งสีที่คล้ำนี้อาจเป็นผลมาจากการเสื่อมสภาพของเซลล์โดยกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ เมื่อเห็ดได้รับความชื้นมากขึ้น เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นมีเอ็นไซม์ที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (enzymatic browning) เช่น polyphenol oxidase (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549) รวมถึงอาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่พิจารณาจากค่า H° พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 43.25-57.27° เมื่อเก็บรักษานาน 12 เดือน ในทุกสภาวะการทดลอง ซึ่งเป็นค่าที่ยังอยู่ในช่วงระหว่างค่าสีเหลืองและสีแดง

สำหรับค่าปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid; TSS) นอกจากจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้แล้วยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ในด้านการเสื่อมคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งได้อีกด้วย โดยถ้าค่า TSS เปลี่ยนแปลงไปมากแสดงว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองก็มีโอกาสเสื่อมคุณภาพมากตามไปด้วย จากผลการทดลองพบว่า การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C ทำให้ค่า TSS เปลี่ยนแปลงไปไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่าชนิดของบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด และอุณหภูมิการเก็บรักษาทั้ง 2 สภาวะดังกล่าว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในเรื่องรสชาติความหวานและการเสื่อมคุณภาพของเห็ดได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C มีการเปลี่ยนแปลงค่า TSS สูงสุด โดยมีค่าลดลงมากกว่าสภาวะอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเห็ดมีการเสื่อมคุณภาพมากที่สุดในสภาวะดังกล่าว ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับค่า TSS ที่เกิดขึ้นในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ในด้านการเกษตรการเปลี่ยนแปลงไปของค่า TSS สามารถใช้เป็นข้อบ่งชี้

ในการเสื่อมคุณภาพของพืชผลทางการเกษตรได้ โดยพืชผลทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวที่มีการสูญเสียค่า TSS ในอัตราที่ต่ำแสดงว่าพืชผลชนิดนั้นยังมีคุณภาพที่ดีอยู่ ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงค่า TSS ในอัตราที่สูงแสดงว่าพืชผลชนิดนั้นมีคุณภาพลดลง (Hildebrand, 1989, pp. 249-253)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อการวัดคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองในทางการค้า คือ สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน ถึงแม้ปัจจุบันองค์การอาหารและยา ประเทศไทยยังไม่มีการกำหนดปริมาณสารทั้งสองชนิดอย่างชัดเจนในผลิตภัณฑ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง แต่การผลิตเห็ดถั่งเช่าให้มีปริมาณสูงก็ยังเป็นสิ่งที่ผู้เพาะเห็ดต้องการ สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดนี้ จากการทดลองพบว่า การเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองแห้งในบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C เป็นระยะเวลา 12 เดือน ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินคงเหลือในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษาอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิทั้ง 2 สภาวะดังกล่าว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 5°C และ 30°C พบว่า มีปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินคงเหลือต่ำกว่าตัวอย่างที่ถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินลดลงมากกว่าตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่วางไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นในดอกเห็ดได้ Satish et al. (2006, pp. 79-86) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาเห็ดนางรมอบแห้งที่บรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) โดยวิธีการซีลปิดผนึกด้วยความร้อนธรรมดากับวิธีซีลผนึกแบบสุญญากาศ เป็นเวลา 3 เดือน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนคงเหลือ พบว่า เห็ดที่ถูกเก็บรักษาโดยวิธีการซีลปิดผนึกด้วยความร้อนธรรมดาได้รับความชื้นสูงกว่าและมีปริมาณของโปรตีนที่ลดลงมากกว่าเห็ดที่ถูกเก็บรักษาโดยวิธีสุญญากาศ ซึ่งให้ผลในทำนองเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ โดยเมื่อเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งได้รับความชื้นมากขึ้นอาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์และเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์เป็นผลทำให้ปริมาณสารสำคัญต่างๆ มีค่าลดลงได้

ชนิดของเอนไซม์ที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase (CAT) (Wang, Gu, & Yuan, 2005, pp. 74-79) นอกจากประโยชน์ต่อการต้านอนุมูลอิสระแล้วกิจกรรมของเอนไซม์ยังเป็นตัวชี้วัดระดับการเสื่อมสภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ สำหรับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ SOD, CAT และ peroxidase (POX) จากการทดลอง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 1-3 เดือนแรกของการเก็บรักษา และเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดอายุการเก็บรักษาในทุกสภาวะการทดลอง โดยเห็นได้ชัดเจนมากเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C สาเหตุการเพิ่มขึ้นและลดลงของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ยังไม่มีรายงานสรุปที่ชัดเจน แต่อาจเป็นไปได้ว่าสภาพที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง 30°C อาจส่งผลต่อสมดุลภายในเซลล์ของดอกเห็ด การเปลี่ยนแปลงของ pH ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนบางชนิด ซึ่งอาจส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้ (Fujikura, & Karssen, 1995, pp. 177-181) หลังจากนั้นปริมาณของเอนไซม์อาจมีปริมาณลดลงเนื่องจากเริ่มมีการเสื่อมสภาพของเซลล์ตามระยะเวลาที่มากขึ้นทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงตามไปด้วย ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Dama et al. (2010, pp. 650-655) ที่ได้ศึกษาการเก็บรักษาเห็ดสดจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Hyspizygus ulmarius*, *Pleurotus florida* PF-01, *Pleurotus florida* PF-01 R5, *Pleurotus platypus* และ *Pleurotus sajor-caju* PSC-04 ในฟิล์มชนิด Polypropylene (PP) ที่อุณหภูมิ 5°C และ 10°C โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ทุก 48 ชั่วโมง จนกระทั่งเห็ดเสื่อมสภาพ ผลการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ SOD พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และสภาวะเครียด (stress) โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ 10°C จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เนื่องจากที่อุณหภูมิที่ 10°C ทำให้เกิดสภาวะเครียดมากกว่า และให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Xing et al. (2008, pp. 11838-11844) ที่ได้รายงานว่าการเก็บรักษาเห็ดชิเมจิสด (*Hypsizygus marmoreus*) ด้วยฟิล์ม biaxially oriented polypropylene (BOPP) เป็นเวลา 24 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C ความชื้นสัมพัทธ์ 65-70% ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังให้ผลในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ ทักษอร บุญชู, และทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย (2551) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 5 ภายหลังการทำ hydro priming พบว่าการ priming เมล็ดข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ที่ระยะเวลา 3-9 ชั่วโมง มีผลทำให้กิจกรรมของ

เอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่แช่น้ำ และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ระยะเวลาการแช่ 6 ชั่วโมง เท่ากับ 6 unit/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 12 เนื่องจากมีการสะสมอนุมูลอิสระขึ้นในช่วงแรกจากการ priming และอนุมูลอิสระค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลามากขึ้นทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามไปด้วย ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวทำให้เข้าใจได้ว่าเมื่อไรก็ตามที่ตัวอย่างเกิดอนุมูลอิสระสูงจะทำให้กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและการเสื่อมสภาพของเซลล์เกิดขึ้นได้สูงตามไปด้วย ส่งผลให้ระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างมีอายุที่สั้นลง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT จะเห็นได้ว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C การเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษามีลักษณะคงที่มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 30°C อาจมีสาเหตุมาจากที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยป้องกันอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ภายในเซลล์ที่อาจเกิดขึ้นได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549) และถึงแม้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT คงเหลือที่วัดได้ในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C (ยกเว้นตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ) จะมีค่าสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C แต่เมื่อพิจารณาแนวโน้มการลดลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30°C แล้วจะเห็นได้ว่ามีค่าลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง และอาจทำให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าตัวอย่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C เมื่อเก็บรักษานานมากกว่า 12 เดือน ซึ่งเห็นผลการเปลี่ยนแปลงชัดเจนในตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C โดยจะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 โดยไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในเดือนที่ 11 เป็นต้นไป ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 5°C ระดับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไม่มากนักตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษา ดังนั้นอาจยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าการเก็บรักษาเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งในภาชนะทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 เดือน จะสามารถรักษาคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C ซึ่งอาจมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตสำหรับผู้ที่สนใจ นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่ามีกลิ่นหืนเกิดขึ้นในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าที่ไม่ได้เก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ใดๆ ที่อุณหภูมิ 30°C ในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษา กลิ่นหืนดังกล่าวอาจเกิดจากการที่เห็ดได้รับความชื้นและออกซิเจนจากบรรยากาศที่อยู่โดยรอบทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆ ขึ้นภายในเซลล์ โดยอาจมีกลไกเช่นเดียวกันกับการเกิดกลิ่นหืนในอาหาร

โดยมีน้ำเป็นสาเหตุเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ทำให้ ไตรกลีเซอไรด์ในโมเลกุลของน้ำมันและไขมันสลายตัวเป็นกรดไขมันอิสระ โดยเฉพาะกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation ทำให้เกิดกลิ่นหืน ส่วนออกซิเจนเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ เช่น lipid oxidation ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นหืนเช่นกัน และยังเป็นผลทำให้อาหารสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ (Frank, & Heather, 11992)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า โดยส่วนใหญ่แล้วในช่วงที่กิจกรรมของเอนไซม์ SOD มีค่าเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่เกิดขึ้นก็จะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาที่สัมพันธ์กันของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยเอนไซม์ SOD ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลังจากนั้นจะมีการทำปฏิกิริยาต่อด้วยเอนไซม์ CAT ทำให้ได้น้ำ (H_2O) และก๊าซออกซิเจน (O_2) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (Scandalios, 1993, pp. 7-12; Stefan, 2007, pp. 1465-1469)

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ที่ไม่สามารถวิเคราะห์หาได้นั้น น่าจะมีสาเหตุมาจากเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C ก่อนทำการเก็บรักษา ซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจทำลายเอนไซม์หรือหยุดการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ โดยมีรายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ POX จะมีความสามารถลดลงเมื่อได้รับความร้อนเพิ่มขึ้น โดยมีการรายงานอุณหภูมิที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ POX ว่า ที่อุณหภูมิ 50°C ขึ้นไป จะทำให้เอนไซม์ POX ที่อยู่ในพืชหัวอาร์ราคาชา (arracacha) ไม่สามารถทำงานได้ (Menolli et al., 2011, pp. 513-518) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ SOD, CAT และ POX ที่เกิดขึ้นในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งเมื่อถูกเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวยังไม่สามารถระบุค่าที่เป็นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ จึงเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับผู้ที่สนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

การทดลองที่ 4

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีจุดประสงค์เพื่อรักษาการมีชีวิตของเซลล์และรักษาคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ให้อยู่ได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่สูญเสียลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะทางฟีโนไทป์และสรีรวิทยา (Chang, & Miles, 2004) สำหรับการผลิตเห็ดเศรษฐกิจทั่วไปนั้น การเก็บรักษาหัวเชื้อในวิธีการที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ดีการเก็บรักษาต้องคำนึงถึงต้นทุนและความสะดวกของวิธีการในการเก็บรักษาด้วย สำหรับเห็ดตระกูลถั่งเช่า (*Cordyceps*) นั้น ดอกเห็ดถูกพัฒนาจากเส้นใยแบบ heterothallic และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพผลิตในดอกเห็ด หรือสโตรมา (stroma) ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาเป็น

ascospores ได้ และในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยเฉพาะไม่มากนัก วิธีการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพและราคาไม่สูงมากนักจะก่อให้เกิดประโยชน์สำหรับผู้ประกอบการที่เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองได้อีกทางหนึ่ง ผู้ประกอบการที่เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเชิงพาณิชย์หลายๆ แห่งจะไม่ค่อยนิยมเก็บหัวเชื้อไว้เอง เนื่องจากมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากและค่าจ่ายสูง หรืออาจยังไม่เข้าใจกระบวนการขั้นตอนของการเก็บรักษาที่ดีพอ ในขณะที่ฟาร์มเพาะเลี้ยงบางแห่งที่เก็บรักษาหัวเชื้อเองจะเลือกใช้วิธีที่ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เช่น การเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น เมื่อต้องการนำมาใช้เพาะเลี้ยงก็จะทำการต่อเชื้อลงในอาหารใหม่ (sub-culture) ไปเรื่อยๆ หลายๆ รุ่น ซึ่งวิธีการนี้มีข้อเสียคืออาจทำให้เกิดการปนเปื้อนและเกิดเชื้อกลายพันธุ์ส่งผลต่อคุณภาพด้านผลผลิตได้

การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) และการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาในระดับไมโครหรือมาโคร (micro- and macro morphological properties) เป็นคุณสมบัติหลักที่ใช้ในการประเมินสิ่งมีชีวิตในระหว่างเก็บรักษาและหลังการเก็บรักษา จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองในเทคนิคที่แตกต่างกัน 8 วิธี ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาหรือเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือเชื้อราชนิดอื่นๆ หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4, 8 หรือ 12 เดือน อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันทั้ง 8 วิธี จะยังคงความมีชีวิตของเซลล์ได้ แต่วิธีการเก็บรักษาในบางเทคนิคส่งผลต่อการคงสภาพของเซลล์ (stability) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยจากการศึกษาการคงสภาพของเส้นใยเชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ถูกเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันได้ประเมินผลจากผลผลิตที่เป็นดอกเห็ด ได้แก่ จำนวนดอก น้ำหนักสด ค่า TSS สีดอก และการผลิตสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปิน หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารข้าวเป็นระยะเวลา 60 วัน ซึ่งพบว่า เส้นใยที่ถูกเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C หรือ 45°C เป็นระยะเวลา 4, 8 หรือ 12 เดือน ให้ผลผลิตที่เป็นจำนวนดอกและน้ำหนักสดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาเชื้อเห็ดในสภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อด้านผลผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทอง ในขณะที่เส้นใยที่มีการต่อเชื้อบนอาหาร PDA และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ทำให้ผลผลิตลดลงตามจำนวนครั้งที่มีการต่อเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อเห็ดด้วยวิธีการดังกล่าวส่งผลกระทบในด้านผลผลิตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สำหรับผลการเก็บรักษาเชื้อเห็ดต่อความแน่นเนื้อของดอกเห็ด พบว่า เส้นใยที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อครั้งที่ 3 ให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในทุกช่วงของการทดสอบ เนื่องจากดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้ในสภาวะดังกล่าวมีลักษณะสั้น และอวบกว่าสภาวะอื่นๆ สำหรับผลการเก็บรักษาเชื้อเห็ดต่อค่า TSS ที่วัดได้ในทุกสภาวะการทดลองในทั้ง 3 ช่วงของการทดสอบ พบว่า ดอกเห็ดมีค่า TSS ไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาในเทคนิคที่แตกต่างกันทั้ง 8 วิธี ไม่มีผลต่อค่า TSS ที่เกิดขึ้นในดอกเห็ด

โดยปกติแล้วเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีสีเหลืองเข้มถึงส้ม สำหรับผลการเก็บรักษาเชื้อเห็ดต่อค่าสีของดอกเห็ด พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันในทุกช่วงของการทดสอบ โดยในวิธีการเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, 45°C และ 55°C ให้ผลค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*) ในระดับที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาในสภาวะดังกล่าวไม่มีผลต่อการเกิดสีหรือรงควัตถุ (pigment) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ในขณะที่เส้นใยที่มีการต่อเชื้อบนอาหาร PDA และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ทำให้ค่าสีแดง (a*) และสีเหลือง (b*) ของดอกเห็ดมีค่าลดลงตามจำนวนครั้งที่มีการต่อเชื้อ โดยเฉพาะการต่อเชื้อครั้งที่ 3 พบว่า มีบางดอกที่เปลี่ยนเป็นสีขาวเกิดขึ้น ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากเกิดการกลายพันธุ์ (Shrestha et al., 2005, pp. 125-130) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อเห็ดด้วยวิธีการต่อเชื้อไปเรื่อยๆ ส่งผลกระทบด้านรงควัตถุของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ผลการเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดต่อปริมาณสารอะดีโนซีน พบว่า ปริมาณสารอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองยังอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเส้นใยถูกเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C, 45°C และ 55°C แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาด้วยเทคนิคเหล่านี้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารอะดีโนซีนที่อยู่ในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ในขณะที่เส้นใยที่มีการต่อเชื้อบนอาหาร PDA และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนลดลงตามจำนวนครั้งที่มีการต่อเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อเห็ดด้วยวิธีการดังกล่าวส่งผลกระทบต่อปริมาณสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สำหรับผลการเก็บรักษาเส้นใยเชื้อเห็ดต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปิน พบว่า ปริมาณสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองยังอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเส้นใยถูกเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10%, วิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาด้วยเทคนิคเหล่านี้ไม่มีผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง สำหรับวิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C บนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณสารคอร์ไดเซปินมีค่าลดลงตามระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง โดยสารคอร์ไดเซปินมีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเส้นใยถูกเก็บรักษาบนเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C ซึ่งการอบแห้งที่อุณหภูมิดังกล่าวทำให้ความชื้นของเมล็ดข้าวนึ่งมีค่าต่ำสุด จึงอาจเป็นไปได้ว่า ระดับความชื้นที่มีอยู่ในเมล็ดข้าวนึ่งมีผลต่อการรักษาคุณภาพของเชื้อในด้านการผลิตสารคอร์ไดเซปิน และยังให้ผลในลักษณะเดียวกันกับวิธีการเก็บรักษาเส้นใยบนอาหาร PDA และมีการต่อ โดยปริมาณสารคอร์ไดเซปินลดลงตามจำนวนครั้งที่มีการต่อเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาเชื้อเห็ดด้วยวิธีการดังกล่าวส่งผลกระทบในด้านการผลิตสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อพิจารณาวิธีการเก็บรักษาในแต่ละเทคนิคจะเห็นได้ว่า การเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% สามารถรักษาคุณภาพของเชื้อได้ดีในทุกๆ ด้านของการประเมินและมีค่าใกล้เคียงกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) เนื่องจากที่อุณหภูมิดังกล่าวจะทำให้ลดอัตราการใช้พลังงานของเซลล์ นอกจากนี้กลีเซอรอลที่ใช้ในการเก็บรักษาเป็นสารที่มีคุณสมบัติช่วยปกป้องเซลล์ที่อาจถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็งได้ (Mata, & Pérez-Merlo, 2003, pp. 14-20) อย่างไรก็ตามหลังจากการเก็บรักษาเส้นใยในสภาวะดังกล่าวแล้วเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เส้นใยเริ่มมีการฟื้นตัวเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ช้ากว่าการเก็บรักษาด้วยเทคนิคอื่นๆ โดยใช้เวลาประมาณ 2 วัน ในการฟื้นตัว ในขณะที่การเก็บรักษาด้วยเทคนิคอื่นๆ ใช้เวลา 1 วัน ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Mata, & Pérez-Merlo (2003, pp. 14-20) ที่รายงานว่า ไมซีเลียมหรือเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ต่างๆ ที่ถูกเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA จะทำให้มีการเจริญล่าช้ากว่าวิธีอื่นๆ เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพเซลล์ต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป จากรายงานการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งสามารถรักษาการรอดชีวิตของเซลล์ของเชื้อราได้มากกว่า 5 ปี (Nakasone et al., 2004, pp. 37-47) และวิธีนี้นิยมใช้ในการเก็บรักษาเชื้อในหน่วยงานทั่วไปโดยตู้แช่แข็งที่มีลักษณะพิเศษ อย่างไรก็ตามข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้อุปกรณ์

และค่าซ่อมบำรุงค่อนข้างสูง และมีการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งในระหว่างการเก็บรักษา รวมทั้งอาจมีผลเสียต่อการเก็บรักษาได้ในกรณีที่ไฟฟ้าดับ (Humber, 1997, pp. 269-279)

สำหรับการเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10% และเก็บรักษาในเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C หรือ 45°C พบว่า มีประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพของเชื้อดีใกล้เคียงกับการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -80°C และใกล้เคียงกับเส้นใยที่เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา (control) จากรายงานการเก็บรักษาเส้นใยหรือไมซีเลียมของเชื้อราในกลีเซอรอล 10% สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้ (Nakasone et al., 2004, pp. 37-47) และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7°C สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาเมทาบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์ได้เป็นระยะเวลานาน (Smith and Onions, 1994) สำหรับวิธีการรักษาในเมล็ดข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งนั้น จะเห็นได้ว่า ข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ให้ผลผลิตจำนวนดอก น้ำหนักสด และปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินสูงกว่าข้าวนึ่งที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C อาจมีสาเหตุมาจากความชื้นที่เหลืออยู่ในเมล็ดข้าวหลังการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55°C นั้นอาจมีความเหมาะสมต่อการดำรงอยู่ของเชื้อเห็ดน้อยกว่าเมล็ดข้าวที่อบแห้งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C โดยจากการวัดความชื้นเมล็ดข้าวหลังจากอบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 35°C, 45°C และ 55°C มีค่าเท่ากับ 35.82%, 33.65% และ 29.21% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับความชื้นประมาณ 35.82% ถึง 33.65% ในเมล็ดข้าวเป็นความชื้นที่อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากรายงานของ Tariq et al. (2013, pp. 147-151) รายงานว่า การเก็บรักษาเชื้อราในเมล็ดธัญพืชที่อุณหภูมิ -20°C สามารถเก็บรักษาเชื้อรามากกว่า 2 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเชื้อ ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ที่สามารถเก็บรักษาเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองในเมล็ดข้าวนึ่งเช่นเดียวกัน ถึงแม้อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาจะแตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถเลือกนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสำหรับเพาะเลี้ยงต่อไปในอนาคตได้ในทุกระดับ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย ประหยัด และมีประสิทธิภาพสูง

สำหรับการเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5°C บนอาหาร PDA ที่มีการต่อเชื้อจำนวน 3 ครั้ง จะเห็นได้ว่า เชื้อราเห็ดถั่งเช่าสีทองยังคงมีชีวิตและไม่เกิดการปนเปื้อน แต่เมื่อพิจารณาถึงการคงคุณภาพของเชื้อในด้านผลผลิต คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของดอกเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ พบว่า คุณภาพของเชื้อเห็ดลดลงเมื่อความถี่ของการต่อเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับงานวิจัยของ Sung et al. (2006, pp. 196-199) ที่ได้รายงานว่า

ผลผลิตและคุณภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีประสิทธิภาพลดลงเรื่อยๆ เมื่อหัวเชื้อถูกต่อเชื้อมาหลายรุ่น และให้ผลในลักษณะเดียวกับ Roy et al. (2014, pp. 200-214) ที่ได้รายงานว่า การเก็บรักษาเชื้อราแมลงโดยวิธีต่อเชื้อลงในอาหารใหม่ไปเรื่อยๆ จะทำให้คุณภาพของเชื้อลดลงในระยะยาว นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้านพันธุศาสตร์และการสูญเสียความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (Nakasone et al., 2004, pp. 37-47) ดังนั้นวิธีการดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อใช้สำหรับทำการเพาะเห็ดในระดับเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่ แต่อาจเหมาะสมสำหรับผู้ทำการเพาะเลี้ยงขนาดเล็กหรือผลิตไว้รับประทานเองในครัวเรือนเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และประหยัด

การทดลองที่ 5

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการวัดปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปคโทรสโกปี (NIRS) โดยออกแบบตัวอย่างเห็ดก่อนการวัดให้แตกต่างกัน 4 รูปแบบ คือ ดอกสด ดอกสดสับละเอียด ดอกอบแห้งที่บดเป็นผงและสารสกัดในกระดาษกรองใยแก้ว จากนั้นนำไปวัดสเปกตรัมในช่วงคลื่น (wavenumber) ระหว่าง 12500-3500 cm^{-1} พบว่า เส้นสเปกตรัมโดยภาพรวมเมื่อได้รับพลังงานทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือนของพันธะและมีการดูดกลืนระดับต่ำในช่วงเลขคลื่นจาก 9000 cm^{-1} ถึง 8500 cm^{-1} โมเลกุลมีการสั่นของพันธะและมีการดูดกลืนสูงขึ้นในระดับ first overtone ในช่วงเลขคลื่นจาก 8500 cm^{-1} ถึง 6700 cm^{-1} และโมเลกุลมีการสั่นของพันธะและมีการดูดกลืนสูงสุดในระดับ combination ในช่วงเลขคลื่นจาก 7500 cm^{-1} ถึง 4000 cm^{-1} สำหรับสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินนั้นคาดว่าในช่วงเลขคลื่น 7500 cm^{-1} ถึง 4000 cm^{-1} ทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของพันธะระหว่างอะตอมของ C=O, N-H, C-H และ C-C (Siesler et al., 2002) ซึ่งอะตอมเหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งในโมเลกุลของน้ำ น้ำตาลชนิดต่างๆ ในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในกลุ่มของโปรตีน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโมเลกุลของสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทสและโปรตีนที่เป็นเบสอะดีนีนตามที่ได้อธิบายไว้ในบทที่ 2 จากผลการทดลองนี้มีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Xie et al. (2015, pp. 971-977) ที่ได้ทำการศึกษาการประเมินหาปริมาณสารอาร์จินีน (arginine) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าทิเบตโดยเทคนิค FT-NIR spectroscopy พบว่า ในช่วงเลขคลื่นจาก 7500 ถึง 5500 cm^{-1} และจาก 5000 ถึง 4000 cm^{-1} เป็นช่วงที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนและโปรตีนชนิดต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของสารอาร์จินีน

เมื่อนำสเปกตรัมที่วัดได้ไปใช้ในการสร้างแบบจำลองเพื่อสร้างและทดสอบสมการในการทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินร่วมกับค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน HPLC โดยใช้สเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) เปรียบเทียบกับสเปกตรัมที่มีการปรับแต่ง 2 วิธี คือ วิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) พบว่า เส้นสเปกตรัมของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 แบบ ที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE มีการขยับขึ้นของเบสไลน์ (baseline shift) เชิงเส้นลดลง เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นการลบโดยค่าคงที่ สเปกตรัมจะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ต่ำสุด คือ มีค่าเท่ากับศูนย์ ส่วนสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี SNV พบว่า จะทำให้ความสูงของแถบการดูดซับลดลงแต่โครงสร้างข้อมูลของเส้นสเปกตรัมยังคงอยู่เนื่องจากการ normalization ซึ่งวิธีนี้ถูกใช้เพื่อการกำจัดผลกระทบของเส้นทางผ่านเชิงแสง (optical path length) ที่แตกต่างกัน (Tripathi, & Mishra, 2009, pp. 840-846; Hassan et al., 2015, pp. 109-117)

จากการทดสอบเพื่อหาแบบจำลองที่ดีที่สุดในการสร้างสมการเพื่อทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบที่แตกต่างกัน พบว่า แบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม โดยให้ค่า coefficient of determination of prediction (R^2_p) สูงสุดเท่ากับ 0.95 ซึ่งค่าในระดับนี้สามารถนำไปใช้ทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance) ได้, ค่า RPD สูงสุดเท่ากับ 5.04 ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในระดับดี (good) สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณในการควบคุมคุณภาพ (quality control) ได้ (รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555), ค่า bias เท่ากับ -8.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ ค่า standard error of prediction (SEP) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 27.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อทำการทดสอบความแม่นยำของสมการอีกครั้งกับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่ากลุ่มใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า ให้ผลการทำนายสารอะดีโนซีนใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสมการ ได้แก่ ค่า bias, ค่า SEP และค่าความชัน (slope) พบว่า ค่า bias ของสมการดังกล่าวไม่แตกต่างไปจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับค่า SEP มีค่าต่ำพอที่ยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่าความชันของสมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นแบบจำลองของสมการที่สร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัมจึงเป็นแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารอะดีโน-ซีน ผลการทดลองนี้ให้ผลในลักษณะเดียวกันในด้านการไม่ปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อสร้างสมการทำนาย โดยให้ผลเช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Chang-ji et al. (2009, pp. 578-582)

ที่ได้รายงานว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายหาปริมาณสารพอลีแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) โดยเทคนิค NIRS ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองสร้างจากสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง นอกจากนี้ยังให้ผลในลักษณะเดียวกันกับการทดลองของ Xie et al. (2015, pp. 971-977) ที่ได้รายงานการประเมินหาปริมาณสารอาร์จินีน (arginine) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าทิเบตโดยเทคนิค FT-NIRS ว่าสร้างจากสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่งเช่นเดียวกัน และยังคล้ายกับรายงานของ Hassan et al. (2015, pp. 109-117) ที่รายงานว่าสาร ฟลาโวนอยด์โดยรวมในข้าวจีนสายพันธุ์ป่าสามารถทำนายได้โดยวิธี NIRS ที่ไม่มีการปรับแต่งสเปกตรัม

สำหรับแบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกอบแห้งที่บดละเอียดและมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE โดยให้ค่า R^2_p สูงสุดเท่ากับ 0.99 ซึ่งค่าในระดับดังกล่าวสามารถนำไปใช้ได้ทุกงาน (any application) ค่า RPD สูงสุดเท่ากับ 12.70 ซึ่งค่าดังกล่าวอยู่ในระดับยอดเยี่ยม (excellent) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทุกงาน (รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555) ค่า bias เท่ากับ -29.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า SEP มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 198.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่เมื่อทำการทดสอบความแม่นยำของสมการอีกครั้งกับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่ากลุ่มใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า แบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE โดยให้ผลการทำนายสารคอร์ไดเซปินใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด โดยสมการดังกล่าวมีค่า R^2_p เท่ากับ 0.98 ซึ่งค่าในระดับดังกล่าวสามารถนำไปใช้ได้ทุกงาน ค่า RPD เท่ากับ 8.90 ซึ่งอยู่ในระดับยอดเยี่ยม สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทุกงานเช่นเดียวกัน (รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, 2555) ค่า bias เท่ากับ -1.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ ค่า SEP มีค่าเท่ากับ 283.69 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของสมการ ได้แก่ ค่า bias ค่า SEP และค่าความชัน (slope) ของสมการดังกล่าว พบว่า ค่า bias ของสมการดังกล่าวไม่แตกต่างไปจาก 0 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับค่า SEP มีค่าต่ำพอที่ยอมรับได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่าความชันของสมการไม่แตกต่างจาก 1 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นแบบจำลองของสมการที่สร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE จึงเป็นแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปิน

จากงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้เกี่ยวกับการทำนายปริมาณสารต่างๆ ในเห็ดตระกูลถั่งเช่าด้วยเทคนิค NIRS โดยส่วนใหญ่แล้วจะทำการศึกษาในเส้นใยเห็ดที่ผ่านการอบแห้ง (Chang-ji et al., 2009, pp. 578-582; Jai-hui et al., 2009, pp. 622-624; Xie et al., 2015, pp. 971-977) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลานาน ในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าแบบจำลองในการสร้างสมการทำนายสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินสร้างจากตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบที่เป็นดอกเห็ดสดที่ถูกสับให้ละเอียด ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจทำให้สามารถลดอิทธิพลเกี่ยวกับความไม่สม่ำเสมอของตัวอย่าง หรือความแน่นเนื้อของตัวอย่างสดที่มีผลต่อค่าดูดกลืนแสงที่อาจเบี่ยงเบนไปเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างในรูปแบบอื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นสิ่งใหม่ที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อทำนายปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิค NIRS แทนการวิเคราะห์แบบเดิมโดยวิธี HPLC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะทำให้สามารถลดขั้นตอนที่ยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างและใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ผลได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างในรูปแบบดอกอบแห้งบดเป็นผง หรือสารสกัดอบแห้งในกระดาษกรองใยแก้ว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมกับเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์อื่นๆ และอาจเลือกใช้ไพรเมอร์ หรือเทคนิคในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ที่หลากหลายมากขึ้น

2. ควรศึกษาสูตรอาหารการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ ที่น่าสนใจเพิ่มเติม

3. ควรศึกษาชนิดของบรรจุภัณฑ์ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองหลังการเก็บเกี่ยวที่หลากหลายมากขึ้น รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาที่แตกต่างกันในหลายระดับ

4. ควรศึกษาการเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นมากกว่า 1 ปี และอาจทำการการเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีอื่นๆ เช่น วิธี lyophization และ cryopreservation ในไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

5. ควรศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เครื่อง NIRS ทำนายคุณภาพด้านอื่นๆ เช่น ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ค่าสี หรือค่าความแน่นเนื้อ เป็นต้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กนกวรรณ ลือดารา, จิราพร กุลสาริน, ไสว บูรณพานิชพันธุ์, และธัญญา ทะพิงค์แก. (2559). การเจริญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) บนดักแด้ไหมไทยพื้นบ้านพันธุ์นางลายและไหมป่าอีรี่. *วารสารเกษตร*, *32*(1), 95-102.

งามทิพย์ ภู่วโรดม. (2538). *ก๊าซกับการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: คอร์นโปรโมชั่น.

จริงแท้ ศิริพานิช. (2549). *ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช*. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ทักษอร บุญชู, และทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. (2550). การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 5 ภายหลังการทำ hydropriming. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *38*(5 ฉบับพิเศษ), 152-155.

ธัญญา ทะพิงค์แก. (2555ข). *การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ: เคหการเกษตร*. เชียงใหม่: ทูโฟร์ พริ้นติ้ง.

ธัญญา ทะพิงค์แก. (2555ก). รู้จักกับเห็ดสกุลถั่งเช่า. *วารสารเคหการเกษตร*, *36*(4), 113-117.

ธัญญา ทะพิงค์แก. (2556). *การวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าว*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย, *ศุภชัย ศรีธิวงค์*, กัญจน์พัชร์ อุปลศิลป์, อภิรดา พรปัณณวิชญ์, อภิชญา ทองทับ, และวรรณพร ทะพิงค์แก. (2557). *การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรถั่งเช่าสีทอง และการนำไปใช้ประโยชน์*. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

นภัสภรณ์ ตั้งจิตวิบูลย์กุล. (2558). *การผลิตทุเรียนหลงลับแลนอกฤดู การประเมินคุณภาพแบบไม่ทำลายโดยใช้เทคนิค Near Infrared (NIR) Spectroscopy และการยืดอายุการเก็บรักษาด้วยสารเคลือบผิวเพื่อการพาณิชย์* (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก.

นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์. (2542). *หลักพื้นฐานเทคนิค Near Infrared Spectroscopy*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิอร โฉมศรี. (2555). *จุลชีววิทยาอาหาร*. เชียงใหม่: เชียงใหม่ปรินท์ติ้ง.

พิมพ์ใจ สีหะนาม, พลกฤษณ์ มณีวระ, คาซูฮิโร นากาโน, และดนัย บุณยเกียรติ. (2559). การประเมินปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในผลเสาวรสด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, *3*(1 ฉบับพิเศษ), 94-101.

ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์, นฤมล พลายงาม, พนิดา พงศ์ภาณุมาพร, อมลยา จตุรภัทร, มรกต ตันติเจริญ, และไนเจล ไฮเวล โรจนส์. (2543). คุณลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันระหว่าง *C. pseudomilitaris* และ *C. militaris*. *วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*, *23*(2), 149-163.

รณฤทธิ์ ฤทธิรณ. (2555). การสร้างระบบ NIR สำหรับการวิเคราะห์ประจำวัน ใน *เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รณฤทธิ์ ฤทธิรณ, ปนัดดา ไกรลาศโอฬาร, และมัลฐิตา อึ้งพานิช. (2551). การประเมินคุณภาพของผลฝรั่งแบบไม่ทำลายเพื่อการค้าในเชิงพาณิชย์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *39*(3 ฉบับพิเศษ), 70-73.

รัฐพล ศรประเสริฐ, อนงคณ์ หัมพานนท์, และสยาม อรุณศรีมรกต. (2559). การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืชและแมลงในท้องถิ่นและประสิทธิภาพการยั้งเชื้อ *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, *26*(2), 239-251.

เรือนแก้ว ประพฤติ, และดนุวัติ เพ็งอ้น. (2553). การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือจำนวน 9 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, *8*(1), 29-38.

วราภรณ์ สุทธิสา. (2556). การพัฒนาสูตรอาหารที่ชักนำการสร้างสโตรมาของเชื้อรา *Cordyceps* sp. *วารสารแก่นเกษตร*, *41*(1 ฉบับพิเศษ), 492-497.

วารุณี บวรรัตโตภาค, โสภณ สิงห์แก้ว, และอุราภรณ์ สะอาดสุด. (2545). ความหลากหลายของ *Cordyceps* จากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่. ใน *เห็ดไทย*. กรุงเทพฯ: สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.

ศุมาพร เกษมสำราญ. (2555). หลักการพื้นฐานของสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. ใน *เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย. (2553). *Plastic intelligence update*. สืบค้น 10 มีนาคม 2559, จาก http://synergysupply.co.th/docs/film_knowledge.pdf

สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์. (2553). *เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพัตรา เปี่ยมวารี, สรวิศ แจ่มจำรูญ, วันทนา สะสมทรัพย์, ธนภักษ์ อินยอด, และสุริวิภา สังขาร. (2554). ผลของการอบแห้งและภาชนะบรรจุในการยืดอายุการเก็บรักษาเห็ดเป๋าฮื้อก้านยาว (*Pleurotus abalonus* Han.) *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *42*(3 ฉบับพิเศษ), 665-668.

สุภา อโนธารมณ์, บุญญวดี จิระวุฒิ, วัชรี วิทยวรรณกุล, ภคินี อัครเวสสะพงศ์, อัจฉรา พยัพพานนท์, และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. (2551). *การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเห็ดฟางสด*. สืบค้น 10 มีนาคม 2559 จาก http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1597

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุวัฒน์ รัตนชัย, และจารุวรรณ บางแวก. (2559). การประเมินปริมาณสาร gamma-aminobutyric acid (GABA) ในเมล็ดถั่วเหลือง และถั่วเขียวโดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy. *วารสารวิชาการเกษตร*, *34*(1), 45-53.

อัจฉรา พยัพพานนท์, บุญญวดี จิระวุฒิ, สุภา อโนธารมณ์, อัจฉรา พยัพพานนท์, และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. (2550). *การยืดอายุเห็ดหอมสด*. สืบค้น 10 มีนาคม 2559 จาก http://www.doa.go.th/doaresearch/files/182_2550.pdf

อัมพร ประสิทธิเวช. (2556). *การผสมระหว่างสายพันธุ์ต่างกันของเห็ดรา Cordyceps militaris*. กรุงเทพฯ: โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัมรา ทองกลิ่น, และพีระศักดิ์ ฉายประสาท (2561). การตรวจสอบคุณภาพทุเรียนหมอนทองแบบไม่ทำลายผลิตผล โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ในเขตจังหวัดอุตรดิตถ์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, *49*(1 ฉบับพิเศษ), 561-566.

AOAC. (2005). *Official methods of analysis* (18th ed.). Washington DC, USA: Association of official analytical chemists.

Bhagyawant, S. S. (2016). RAPD-SCAR Markers: An interface tool for authentication of traits. *Journal of biosciences and medicines*, *4*(1), 1-9.

Bhandari, A. K., Negi, J. S., Bisht, V. K., Rana, C. S., Bharti, M. K., & Singh, N. (2010). Chemical constituent, inorganic elements and properties of *Cordyceps sinensis*. *nature science*, *8*(9), 253-256.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1), 248-254.

Buenz, E. J., Bauer, B. A., Osmundson, T. W., & Motley, T. J. (2005). The traditional chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *Journal of ethnopharmacology*, *96*(1), 19-29.

Cen, H., & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in food science and technology*, *18*(2), 72-83.

Chan, O. C, Liu, W. T., & Fang, H. H. P. (2001). Study of microbial community of brewery-treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water science and technology*, *43*(1), 77-82.

Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). Culture preservation. In *Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact.* Boca Raton, Florida: CRC Press.

Chang-ji, Y., Shi-jie, L., Guo-dong, Y., & Di, W. (2009). Application of near infrared spectroscopy in rapid determination of adenosine and polysaccharide in *Cordyceps militaris*. In *ICNC 2009, Proceedings of fifth international conference on natural computation* (pp.578-582). Tianjin, China: ICNC.

Chen, Y. C., Chen, Y. H., Pan, B. S., Chang, M. M., & Huang, B. M. (2017). Functional study of *Cordyceps sinensis* and *cordycepin* in male reproduction. *Journal of food and drug analysis*, *25*(1), 197-205.

Chen, Y. Q., Hu, B., Xu, F., Zhang, W. M., Zhou, H., & Qu, L. H. (2004). Genetic variation of *Cordyceps sinensis*, a fruit-body-producing entomopathogenic species from different geographical regions in China. *Federation of european microbiological societies microbiology letters*, *230*(1), 153-158.

Cunningham, K. G., Hutchinson, S. A., Manson, W., & Spring, F. S. (1950). Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*, *166*(4231), 949.

Dai, G. W., Bao, T. T., Xu, G. F., Cooper, R., & Zhu, G. X. (2001). CordyMax TM Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *Journal of alternative and complementary medicine*, *7*(3), 231-240.

Dama, L. C., Kuma, S., Mishra, K. B., Shukla, B. K., Mathur, S., & Doshi, A. (2010). Antioxidative enzymatic profile of mushrooms stored at low temperature. *Journal of food science and technology*, *47*(6), 650-655.

Das, S. K., Masuda, M., Sakurai, A., & Sakukabara, M. (2010). Medicinal uses of the mushroom *codyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, *81*(8), 961-968.

Dong, J., Liu, M., Lie, C., Zheng, X., & Wang, Y. (2012). Effect of selenite and light wavelengths on liquid culture of *codyceps militaris* Link. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(8), 2030-2036.

Fghire, R., Ali, O., Anaya, F., Benlhabib, O., Jacobsen, S-E., & Wahbi, S. (2013). Protective antioxidant enzyme activities are affected by drought in quinoa (*Chenopodium quinoa willd*). *Journal of biology, agriculture and healthcare*, *3*(1), 62-68.

Frank, A. P., & Heather, Y. P. (1992). *A handbook of food packaging* (2nd ed.). New York: Blackie Academic & Professional.

Fujikura, Y., & Karssen, C. M. (1995). Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour-related protein and osmopriming-enhanced expression of putative aspartic protease. *Seed Science Research*, *5*(1), 177-181.

Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., ...Okumoto, T. (1994). Fungal metabolites. Part II. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *Journal of antibiotics (Tokyo)*, *47*(2), 208-215.

Furumo, N. C., & Furutani, S. (2008). A simple method for assaying total protein, polyphenol oxidase and peroxidase activity from 'Kaimana' Litchi chinensis Sonn. *Journal of hawaiian and pacific agriculture*, *15*(1), 1-7.

Ghosh, S., & Rodgers, J. (1992). NIR analysis of textiles. In *D. A. Burns, & E. W. Ciurczak (Eds.), Handbook of near-infrared analysis* (p. 495). New York: Marcel Dekker.

Gregori, A. (2014). Cordycepin production by *Cordyceps militaris* cultivation on spent brewery grains. *Acta biologica slovenica*, *57*(2), 45-52.

Gustavo, V. Barbosa-Cánovas, Anthony, J., Fontana, Jr., Shelly, J. S., & Theodore, P. L. (2007). *Water activity in foods: Fundamentals and applications*. Oxford: Blackwell.

Halpern, M. (2002). *Medicinal mushrooms*. New York: M. Evans and Company.

Hassan, H., Fan, M., Zhang, T., & Yang, K. (2015). Prediction of total phenolics and flavonoids contents in chinese wild rice (*Zizania latifolia*) Using FT-NIR spectroscopy. *American journal of food technology*, *10*(3), 109-117.

Hildebrand, D. F. (1989). Lipoxygenase, *Plant physiology*, *76*(1), 249-253.

Holliday, J., & Clevaver, M. (2008). Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*, *10*(3), 219-234.

Holliday, J. C., Cleaver, P., Loomis-Powers, M., & Patel, D. (2004). Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Peck) Samson. *Mycobiol*, *35*(4). 215-218.

Hong, I. P., Nam, S. H., Sung, G. B., Lee, K. G., Cho, S. M., Seok, S. J., ...Guo, S. X. (2009). Chemical composition of main *Cordyceps species* in Korea. *International journal of industrial entomology*, *18*(1), 13-17.

Hong, I. P., Kang, P. D., Kim, K. Y., Nam, S. H., Lee, M. Y., Choi, Y. S., ...Humber, R. A. (2010). Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, *38*(2). 128-132.

Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X., & Zho, X. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research*, *3*(12), 957-961.

Humber, R. A. (1997). Fungi - preservation. In *Lacey, A. L. (Eds.), Manual of techniques in insect pathology* (pp. 269-279). London, UK: Academic Press.

Hung, L. T., Keawsompong, S., Hanh, V. T., Sivichai, S., & Hywel-Jones, N. L. (2009). Effect of temperature on cordycepin production in *Cordyceps militaris*. *Thai journal of agricultural science*, *42*(4), 219-225.

Hur, H. (2008). Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, *36*(4), 233-235.

Hyun, S. H., Jeon, T. W., Lee, S. K., Kim, C. H., Jeong, H., Kang, M. J., ...Jeong, J. C. (2007). Hepatoprotective effects of *Paecilomyces tenuipes* against carbon tetrachloride-induced toxicity in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Journal of toxicology and environmental health*, *23*(4), 301-309.

Hywel-Jones, N. L. (1994). *Cordyceps khaoyaiensis* and *C. pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. *Mycological Research*, *98*(1), 939-942.

International Organization for Standardization. (2010). *Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products - Guidelines for the application of near infrared spectrometry*. Retrieved March 10, 2016, from https://www.iso.org/standard/51197.html

Isaka, M., Kittakoop, P., Kirtikara, K., Hywel-Jones, N. L., & Thebtaranonth, Y. (2007). Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Accounts of Chemical Research*, *38*(10), 813-823.

Jayathunge, K. G. L. R., & Illeperuma, C. K. (2001). Dehydration of oyster mushroom and studies on acceptability and storability of the product. *Tropical Agricultural Research*, *13*(1), 69-77.

Ji, D. B., Ye, J., Li, C. L., Wang, Y. H., Zhao, J., & Cai, S. Q. (2009). Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract. *Phytotherapy Research*, *23*(1), 166-122.

Jia-hui, L., Di, W., Qing-fan, M., Hong-ru, T., & Li-rong, T. (2009). Determination of the protein content in *Cordyceps militaris* by near infrared spectroscopy quantitative model based on partial least squares method. *World Congress on computer science and information engineering* (pp. 622-624). USA: Los Angeles, Anaheim.

Kan, H., Ming, L., Li, C., Sun, B., & Liang, Y. (2010). Antidepressant effect of bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* in mice and rats. *Neural Regeneration Research*, *5*(20), 1568-1572.

Kaur, L., Dhanda, S., Sodhi, H. S., Kapoor, S., & Khanna, P. K. (2011). Storage and preservation of temperate mushroom cultures, *Agaricus bisporus* and *pleurotus florida*. *Indian Journal of Microbiology*, *51*(2), 234-238.

Kim, S. Y., Shrestha, B., Sung, G. H., Han, S. K., & Sung, J. M. (2010). Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *cordyceps cardinalis*. *Mycobiology*, *38*(2), 133-136.

Kodoya, T. (1990). *Food Packaging*. California: Academic Press.

Lazer, H. (2014). *Cordyceps: The most brutal of fungi*. Retrieved November 12, 2016, from http://www.lazerhorse.org/2014/12/19/cordyceps-parasite-insect-fungus-info/

Lee, S. Y., Nakajima, I., Ihara, F., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2005). Cultivation of entomopathogenic fungi for the search of antibacterial compounds. *Mycopathologia*, *160*(4), 321-325.

Lee, S. M., Park, N. S., Jin, B. R., Kang, H. S., Jung, J. H., & Park, E. (2006). Effects of *Paecilomyces tenuipes* cultivated in egg yolk on lipid metabolism in rats on a high fat-cholesterol diet. *Journal of Medicinal Food*, *9*(2), 214-222.

Li, C., Li, Z., Fan, M., Cheng, W., Long, Y., Ding, T., & Ming, L. (2006). The composition of *Hirsutella sinensis*, *anamorph* of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(8), 800-805.

Li, X. L., & He, Y. (2010). Evaluation of least squares support vector machine regression and other multivariate calibrations in determination of internal attributes of tea beverages. *Food Bioprocess Technology*, *3*(5), 651-661

Liang, H. H., Cheng, Z., Yang, X. L, Li, S., Ding, Z. Q., Zhou, T. S., ...Chen, J. K. (2008). Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Microbiology*, *46*(5), 549-556.

Lim, K., Lee, C. H., & Chang, E. (2012). Optimization of solid state culture condition for the production of adenosine, cordycepin, and d-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Codyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *14*(2), 181-187.

Lin, W. H., Tsai, M. T., Chen, Y. S., Lai, M. N., & Jeng, K. C. G. (2007). Improvement of sperm production in subfertile boars by *Cordyceps militaris* supplement. *The american journal of chinese medicine*, *35*(4), 631-641.

Liu, H. J., Hu, H. B., Chu, C., Lia, Q., & Li, P. (2011). Morphological and microscopic identification studies of Cordyceps and its counterfeits. *Acta Pharmaceutica Sinica B. 1*(3), 189-195.

López, G. M., García-González, A. S., & Franco-Robles, E. (2017). *Carbohydrate analysis by NIRS-chemometrics*. Retrieved December 13, 2017, from http://dx.doi.org/10.5772/67208

Lui, W. C., Chuang, W. L., Tsai, M. L., Hong, J. H., McBride, W. H., & Chiang, C. S. (2008). *Codyceps sinensis* health supplement enhances recovery from taxol-induced leukopenia. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(4), 477-455.

Mains, E. B. (1958). North american entomogenous species of *Cordyceps. Mycologia*, *50*(1), 169-222.

Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2006). Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Codyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(1), 641-646.

Mata, G., & Pérez-Merlo, R. (2003). Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Cryobiology*, *4*(1), 14-20.

Mata, G., & Savoie, J. M. (2013). Preservation of *Agaricus subrufescens* strains at low temperature by using cultures on sorghum grains. *Revista Iberoamericana de Micología*, *30*(2), 96-102.

Mei, Z., Zhou, B., Wei, C., & Cheng, J. (2015). Genetic authentication of gardenia jasminoides ellis var. grandiflora Nakai by improved RAPD-derived DNA markers. *Molecules*, *20*(1), 20219-20229.

Menolli, N. L., Finger, L. F., Barbosa, M. J., Correia, D. T., & Vieira, L. M. (2011). Peroxidase activity in roots of arracacha affected by pH and temperature. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *33*(3), 513-518.

Moges, A. D., Admassu, B., Belew, D., Yesuf, M., Njuguna, J., Kyalo, M., & Ghimire, S. R. (2016). Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLoS ONE*, *11*(3), e0151257.

Mushroomobserver. (2015). *Isaria tenuipes Peck*. Retrieved October 12, 2017, from https://mushroomobserver.org/image/show_image/66317?obs=28871

Naik. S., Ramachandra, M., Tulasidas, T., Rajashekharappa, K. S., Murali, K., & Mallesha, B. C. (2005). Postharvest (stotage) studies for dried Oyster mushroom (*Pleaurotus florida*). *Journal of dairying, foods & home sciences*, *24*(2), 146-149.

Nakasone, K. K., Peterson, W. S., & Jong, S. C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. In *Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (Eds.), Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods* (pp. 37-47). San Diego, California: Elsevier Academic Press.

Narongwongwattana, S., Rittiron, R., & Hock, L. C. (2015). Rapid determination of alkalinity (ammonia content) in Para rubber latex using portable and Fourier transform-near infrared spectrometers. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *23*(1), 181-188.

Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical.

Park, S. S., Ryu, Y. B., Lee, Y. H., Cho, Y. U., Cho, S. J., Ju, C. Y., ...Gal, S. W. (2007). Inhibition of melanin synthesis by mycelial culture broth of *Paecilomyces* japonica in the mulberry leaf extract. *Journal of Life Sciences*, *17*(6), 816-820.

Paterson, R. R. (2008). *Cordyceps*: a traditional chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory. *Phytochemistry*, *69*(1), 1469-1495.

Prajapati, P., Solanki, R., Modi, V., & Basuri, T. (2016). A brief review on NIR spectroscopy and its pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*, *3*(3), 117-123.

Prieto, N., Pawluczyk, O., Dugan, M. E. R., & Aalhus, L. J. (2017). A review of the principles and applications of near-infrared spectroscopy to characterize meat, fat, and meat products. *Applied Spectroscopy*, *71*(7), 1403-1426.

Ritthiruangdej, P., Ritthiron, R., Shinzawa, H., & Ozaki, Y. (2011). Non-destructive and rapid analysis of chemical compositions in Thai steamed pork sausages by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *129*(1), 684-692.

Roy, C. B., Srinivas, P., & Jacob, C. K. (2014). Relative efficacy of long–term storage methods on survival and virulence of *Corynespora cassiicola* and *Phytophthora meadii* pathogenic on rubber *(Hevea brasiliensis)*. *Rubber Science*, *27*(2), 202-214.

Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, *101*(1), 7-12.

Schmidt, K., Li, Z., Schubert, B., Huang, B., Stoyanova, S., & Hamburger, M. (2003). Screening of entomopathogenic deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseaces of the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(2-3), 288-297.

Shashidhar, M. G., Giridhar, P., Sankar, U. K., & Manohar, B. (2013). Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement. *Journal of Functional Foods*, *5*(3), 1013-1030.

Shenk, J. S., Workman, J. J. Jr., & Westerhaus, M. O. (1992). Application of NIR spectroscopy to agricultural products, In *D. A. Burns, & E. W. Ciurczak (Eds.), Handbook of Near-Infrared Analysis*, (vol. 13), (pp. 383-431). New York: Marcel Dekker.

Shih, L. I., Tsai, L. K., & Hsies, C. (2007). Effect of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militalis*. *Biochemical Engineering Journal*, *33*(1), 193-197.

Shrestha, B., Choi, S. K., Kim, H. K., Kim, T. W., & Sung, J. M. (2005). Genetic Analysis of Pigmentation in *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, *33*(3), 125-130.

Shrestha, B., Lee, W. H., Han, S. K., & Sung, J. M. (2006). Observation on some of the mycelial growth the pigmentation characteristics of *Cordyceps militalis* isolate. *Micobiol*, *34*(2), 83-91.

Shrestha, B., Weimin, Z., Yongjie, Z., & Xingzhong, L. (2010). What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae). *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*, *1*(4), 228-236.

Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heis, H. M., (2002). *Near-infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications*. Germany: WILEY-VCH Verlag GMbH.

Stefan. I. L., & Irwin F. (2007). The effects of superoxide dismutase on H_2O_2 formation. *Free Radical Biology and Medicine*, *42*(1), 1465-1469.

Stensrud, O., Hywel-Jones, N. L., & Schumacher, T. (2005). Towards a phylogenetic classification of Cordyceps: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycological Research*, *109*(1), 41-56.

Sugar, A. M., & McCaffrey, R. P. (1998). Antifungal activity of 3′-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *42*(1), 1424-1427.

Sung, J. M., Park, Y. J., Lee, J. O., Han S. K., Lee, W. H., Choi, S. K., & Shrestha, B. (2006). Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* In Vitro. *Mycobiology*, *34*(4), 196-199.

Takano, F., Yahagi, N., Yahagi, R., Takada, S., Yamaguchi, M., Shoda, S., ...Ohta, T. (2005). The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (=*Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces* cicadae (Miquel) Samson (=*Isaria sinclairii* (Berk.) Llond) regulate Th1 and Th2 cytokine response in murine Peyer's patch cells in vitro and ex vivo. *International Immunopharmacology*, *5*(1), 903-916.

Tariq, A., Naz, F., Rauf, A. C., & Irshad, G. (2015). Long term and least expensive preservation method for various fungal culture. *pakistan journal of phytopathology*, *27*(02), 147-151.

TingChi, W., MinFeng, Li., JiChuan, K., & Jing, H. (2012). A molecular genetic study on fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(24), 5215-5221.

Tripathi, S., & Mishra, H. N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, *20*(1), 840-846.

Tuli, H. S., Sharma, A. K., & Sandhu, S. S. (2014). Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. *Journal of Biological Chemistry*, *1*(1), 35-47.

Türker-Kaya, S., & Huck, W. C. (2017). A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules*, *22*(168), 1-20.

Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., & Sawamura, M. (1997). Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Tetrazolium Salt 3*-{1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic Acid Hydrate Reduction by Xanthine–Xanthine Oxidase. *Analytical biochemistry*, *251*(1), 206-209.

Wang, L., Zhang, W. M., Hu, B., Chen, Y. Q., & Qu, L. H. (2008). Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Diversity*, *31*(1), 147-155.

Wang, Z. Gu, Y., & Yuan, Q. (2005). Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. *Current Microbiology*, 52(1), 74-79.

Wasser, S. P. (2002). Mediciinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(3), 258-274.

Wen, T. C., Li, M. F., Kang, J. C., & He, J. (2012). A molecular genetic study on fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(24), 5215-5221.

Wikimedia. (2008). *Cordyceps militaris*. Retrieved October 12, 2017, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2008-12-14_Cordyceps_militaris_310712806.jpg

Wikipedia. (2017). *Isaria sinclairii*. Retrieved October 12, 2017, from https://en.wikipedia.org/wiki/Isaria_sinclairii#/media/File:FourIsariasinclairii.jpg2

Winkler, D. (2008). *Yartsa Gunbu* (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy. *Economic Botany*. *62*(3), 291-305.

Wu, J. Y., Zhang, Q. X., & Leng, P. H. (2007). Inhibitory effect of ethyl acetate extract of *Codyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture nd B16 melanoma in C57BL/6 mice. *Phytomedicine*, *14*(1), 43-49.

Xie, C., Xu, N., Shao, Y., & He, Y. (2015). Using FT-NIR spectroscopy technique to determine arginine content in fermented *Cordyceps sinensis* mycelium. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *149*(1), 971-977.

Xing, Z., Wang, Y., Feng, Z., & Tan, Q. (2008). Effect of different packaging films on postharvest quality and selected enzyme activities of *Hypsizygus marmoreus* mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(1), 11838-11844.

Xiong, C., Xia, Y., Peng, Z., Shi, S., & Wang, C. (2010). TMYC Developmental stage-specific gene expression profiling for a medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *An International Journal on Fungal Biology*, *1*(1), 25-66.

Xu, T., Wang, H., Xu, Q., Hua, Z., & Lin, C. (2001). Biological characteristics of *Platylomia pieli*. *Forest Research*, *14*(4), 396-402.

Yu, H. M., Wang, B. S., Huang, S. C., & Duh, P. D. (2006). Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Codyceps sinensis* against oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(8), 3138-3188.

Yuan, F., Yu, H., Zuo, S., & Adams, A. (2015). Development of EST-SSR for preliminary analysis of genetic diversity of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Systematics and Ecology*, *58*(1), 126-131.

Zhao, J., Xie, j., Wang, L. Y., & Li, S. P. (2014). Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *87*(1), 271-289.

Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X., Zhang, S., ...Wang, C. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional *Chinese medicine*. *Genome Biology*, *12*(1), 1-21.

Zhu, J. S., Haipern, G. M., & Jones, K. (1998). The sciencific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *4*(3), 289-303.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน

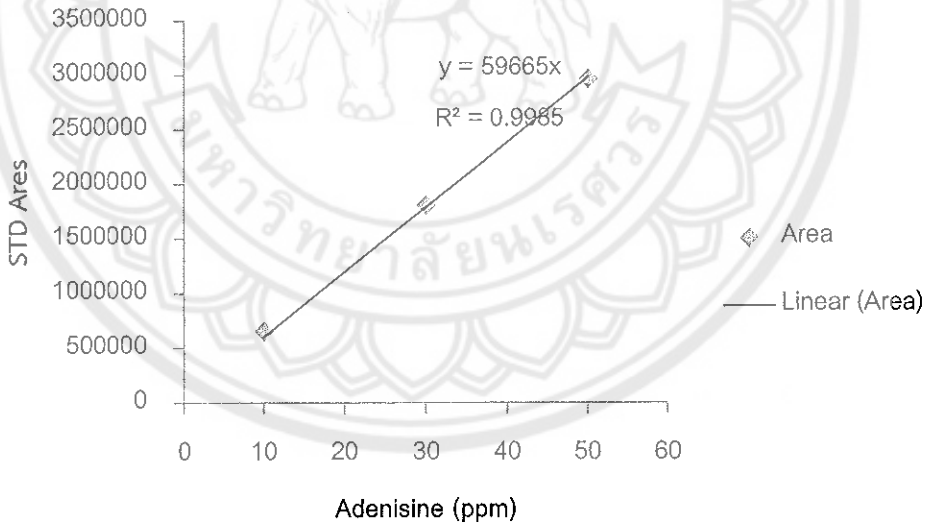
ก-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีน

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ดังนี้

1.1 ชั่งสารอะดีโนซีน ปริมาณ 0.025 กรัม เติมน้ำ (HPLC grade) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนให้สารละลาย

1.2 ปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร จะได้ Stock ของสารละลายที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1,000 ppm

1.3 ทำการเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-50 ppm คือ 10, 30 และ 50 ppm โดยดูดสารจาก Stock ของสารละลายมาปริมาตร 10, 30 และ 50 ไมโครลิตร ใส่แยกลงในขวดปรับปริมาตร และเติมน้ำ HPLC ให้ครบ 1,000 ไมโครลิตร (990, 970 และ 950 ไมโครลิตร ตามลำดับ) จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5°C



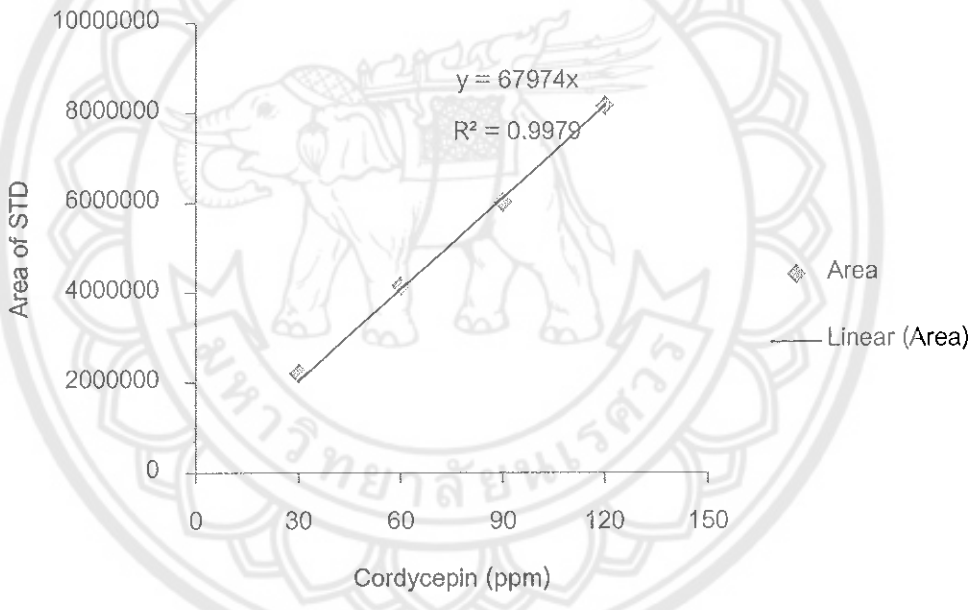
ภาพ ก-1 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐานของสารอะดีโนซีน (adenosine)

ก-2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปิน

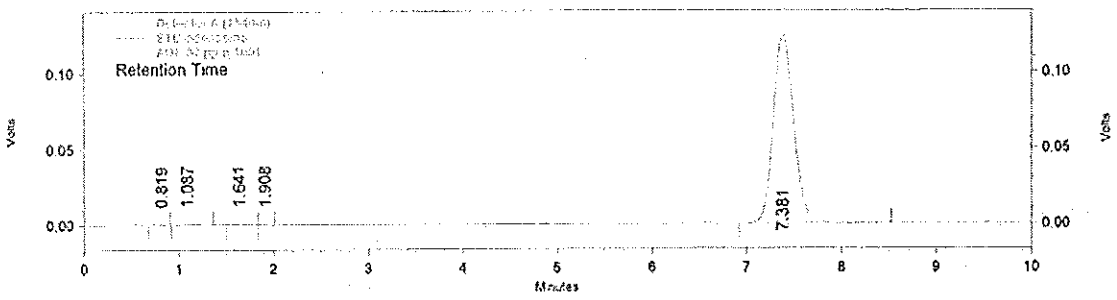
ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ดังนี้

2.1 ชั่งสารคอร์ไดเซปิน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม เติมน้ำ (HPLC grade) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนได้สารละลายสีใส

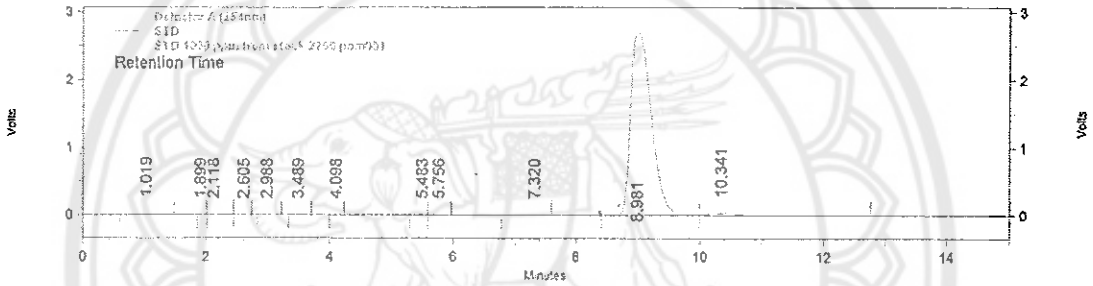
2.2 ทำการเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-120 ppm คือ 30, 60 และ 120 ppm โดยดูดสารจาก Stock ของสารละลายมาปริมาตร 30, 60 และ 120 ไมโครลิตร ใส่แยกลงในขวดปรับปริมาตร และเติมน้ำ HPLC ให้ครบ 1,000 ไมโครลิตร (970, 980 และ 880 ไมโครลิตร ตามลำดับ) จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5°C



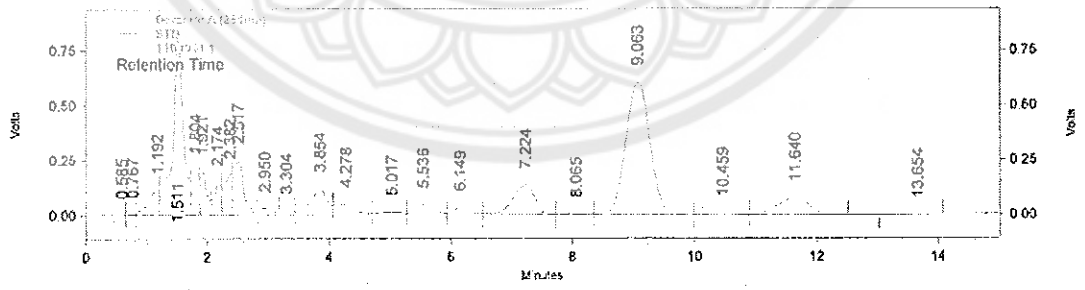
ภาพ ก-2 กราฟแสดงสารละลายมาตรฐานของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin)



ภาพ ก-3 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีน (adenosine) ที่แสดงผลในนาทีที่ 7.381 ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพ ก-4 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปิน (cordycepin) ที่แสดงผลในนาทีที่ 8.981 ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพ ก-5 ลักษณะโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินด้วยเครื่อง HPLC ของสารสกัดจากตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงจากสูตรอาหาร M10

ภาคผนวก ข ผลคะแนนจากการทำ banding score ของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 สายพันธุ์

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
OPD-03	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPB-06	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	1	1	1	1	1	1

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPB-20	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	0	1	0	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPA-03	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	1	1	1	1	1	1
	1100	6	1	1	1	1	1	1
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	1	1	1	1	1	1
	200	15	1	1	1	1	1	1
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPA-06	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	0	1	1	1	1
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPA-10	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	0	1	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	1	1	1	1	1	1
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPA-17	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	1	0	1	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	1	0	1	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPD-06	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	1	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	1	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
S51	3000	1	0	0	0	0	0	0
OPD-11	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	1	1	1	1	1	1
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	1	1	1	1	1	1
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	1	1	1	1	1	1
	100	16	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
OPC-01	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	1	0	1	1	1	1
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	0	1	0	0	0
	600	11	1	0	1	1	1	1
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPC-07	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	0	1	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	1	0	1	1	1	1
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	0	1	1	1	1
	600	11	1	0	1	1	1	1
	500	12	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPC-19	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	1	1	1	1	1	1
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	1	1	1	1	1	1
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	1	0	0	1	0	0
	200	15	0	1	0	1	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPC-20	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	0	1	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	1	0	1	1	1	1
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	1	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
S90	3000	1	0	0	0	0	0	0
OPG-10	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	1	1	1
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	1	0	1	1	1	1
	300	14	1	0	1	1	1	1
	200	15	1	0	1	1	0	0
	100	16	1	0	0	1	0	0
OPG-12	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	1	0	1	0	1	1
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	1	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPH-03	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	0	1	1	1	1
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	1	1	1	1	1	1
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPF-16	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	1	1	1	1	1	1
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPF-20	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	1	1	0	0	0	1
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
OPE-11	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	1	1	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	1	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	1	1	0	0	1	1
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPE-13	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	1	1	0	1	1	1
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	1	1	0	1	1	1
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	0	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	1	1	1	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	300	14	0	0	0	0	1	1
	200	15	1	1	1	1	1	1
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPT-16	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	1	1	1	1	1	1
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	0	0	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	1	1	1	1	1	1
	500	12	1	1	1	1	1	1
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPT-19	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	1	0	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	1	1	0	1	1	1
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPX-01	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	1	1	1	1	1
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	1	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	1	1	1	1	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPJ-14	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	1	1	0	1	1	1
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	1	1	1	1	1	1

Primer	Size band	Number	Species					
			CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	1	1	1	1	1	1
	700	10	0	0	0	0	0	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	0	0	0	0	0	0
	400	13	0	0	0	0	0	0
	300	14	0	0	0	0	0	0
	200	15	0	0	0	0	0	0
	100	16	0	0	0	0	0	0
OPJ-20	3000	1	0	0	0	0	0	0
	1500	2	0	0	0	0	0	0
	1400	3	0	0	0	0	0	0
	1300	4	0	0	0	0	0	0
	1200	5	0	0	0	0	0	0
	1100	6	0	0	0	0	0	0
	1000	7	0	0	0	0	0	0
	900	8	0	0	0	0	0	0
	800	9	0	0	0	0	0	0
	700	10	1	1	1	1	1	0
	600	11	0	0	0	0	0	0
	500	12	1	0	1	1	1	0
	400	13	1	0	1	0	0	0
	300	14	1	0	1	1	1	0
	200	15	1	0	0	1	1	0
	100	16	0	0	0	0	0	0

ภาคผนวก ค การเตรียมสารสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และโปรตีน

ค-1 การเตรียมสารสกัด 0.1M sodium phosphate buffer pH 6.4

เตรียมจาก stock 2 ตัวเก็บที่ 4°C ปรับ pH ให้ได้ 6.4

Solution A: เตรียม 0.05M ของ Na_2HPO_4 ปริมาณ 1 L (MW = 119.977 g/mol)

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

1M = 119.977

0.05M = 119.977 x 0.05 = 5.998 g/mol (L)

ดังนั้น ชั่งสาร Na_2HPO_4 ในปริมาณ 5.998 g แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

Solution B: เตรียม 0.05M ของ NaH_2PO_4 ปริมาณ 1 L (MW = 141.958 g/mol)

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

1M = 141.958

0.05 M = 141.958 x 0.05 = 7.097 g/mol (L)

ดังนั้น ชั่งสาร NaH_2PO_4 ในปริมาณ 7.097 g แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

ผสม Solution A และ Solution B เข้าด้วยกัน และปรับ pH ให้ได้ 6.4

ค-2 การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) สำหรับวิเคราะห์โปรตีน (Bradford, 1976)

1. โดยชั่งสาร coomassie brilliant blue G-250 ในปริมาณ 50 mg นำไปละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 50 mL เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น (phosphoric) 85% ปริมาตร 100 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

2. การเตรียมสาร Bovine serum albumin (BSA) เพื่อทำกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยเตรียม stock solution ของ BSA ความเข้มข้น 2 mg/mL ในปริมาตร 25 mL โดยใช้น้ำกลั่นในการเตรียมปริมาตร คำนวณได้ ดังนี้

จากสารละลาย 1000 mL มี BSA = 2 g

ถ้า 25 mL มี BSA = (2 x 25) / 1,000 = 0.05 g

ดังนั้นชั่งสาร BSA 0.05 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 25 mL

3. ทำการเจือจางสาร BSA ให้ได้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 mg/mL โดยคำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ซึ่ง BSA ความเข้มข้นต่างๆ นี้ จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาโปรตีนต่อไป

ตัวอย่าง ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.2 mg/mL หรือ 200 µg/mL จาก stock solution ของ BSA ซึ่งเข้มข้น 2 mg/mL

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

C_1 = ความเข้มข้นของ stock solution ซึ่งเท่ากับ 2 mg/ml (2,000 µg/mL)

V_1 = ปริมาตรที่ต้องดูดออกมาจาก stock ซึ่งเราต้องการทราบ

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่เราต้องการ ซึ่งในที่นี้คือ 0.2 mg/mL

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่เราต้องการ ในที่นี้คือ 3 mL

แทนค่า $2 \times V_1 = 0.2 \times 3$

$V_1 = (0.2 \times 3) / 2$

$= 0.3$ mL หรือ 300 µL

ดังนั้น ให้ดูดจาก stock solution ของ BSA มา 0.3 mL หรือ 300 µL แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 2,700 µL หรือ 2.7 mL เพื่อให้ครบ 3,000 µL หรือ 3 mL

4. เติมสารละลายแบรดฟอร์ด 3 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer (พยายามไม่ให้เกิดฟอง) ทิ้งไว้ 15-60 นาที

5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับ blank ดังแสดงในตาราง ค-2

ตาราง ค-2 การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Test sample (mg/mL)	Sample Vol. (µL)	Vol. water (µL)	Vol. Bradford Reagent (µL)
0 (blank)	0	3,000	3,000
0.2	300	2,700	3,000
0.4	600	2,400	3,000
0.6	900	2,100	3,000
0.8	1,200	1,800	3,000
1.0	1,500	1,500	3,000
1.2	1,800	1,200	3,000