



การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ห้องด้วยกากกาแฟ

วิทยานิพนธ์
ของ
สุภารัตน์ ทะสุญ

พหุ ประจักษ์ วิเว

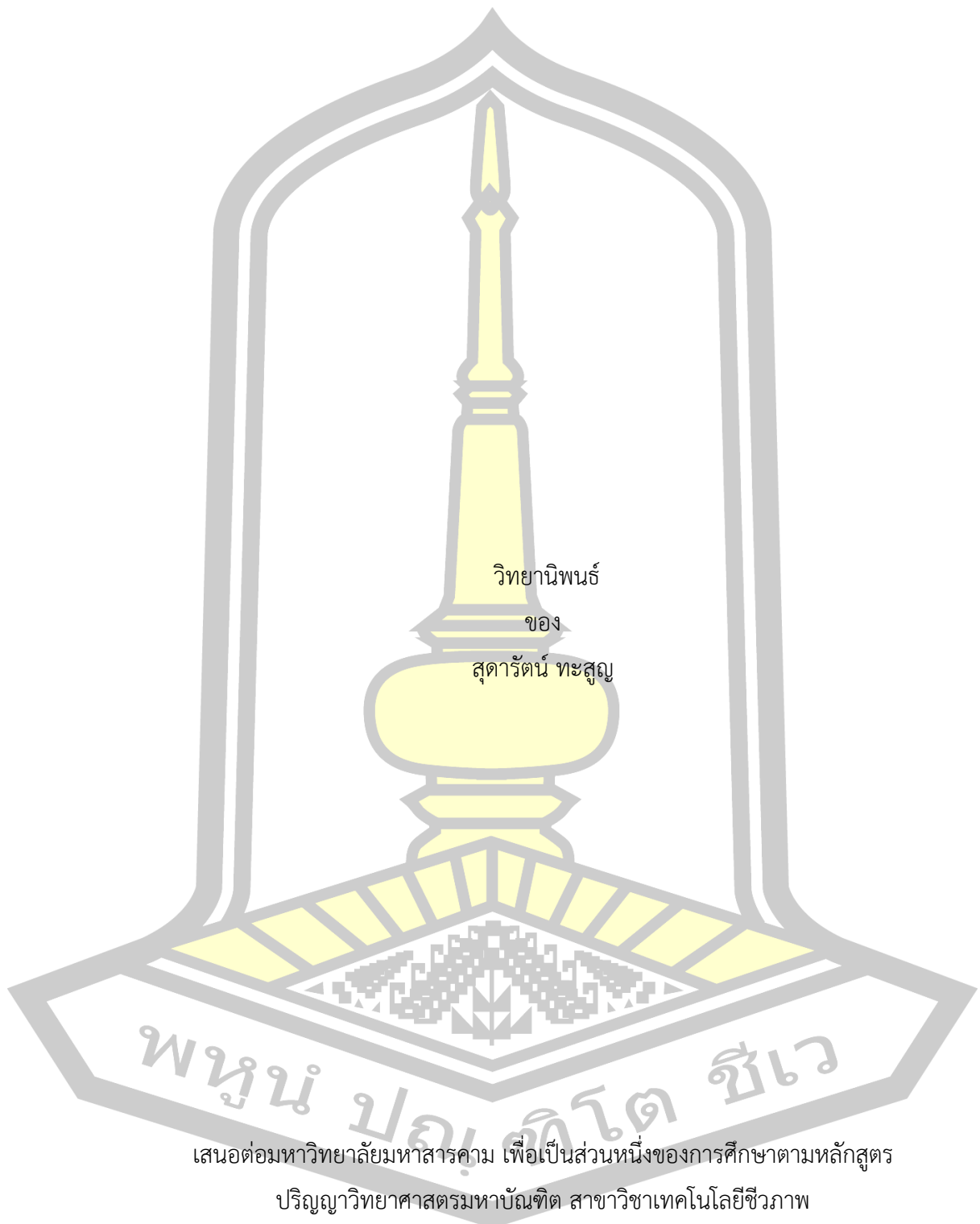
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงงาเข้าสู่ห้องด้วยกากกาแฟ



พูน ปลูกดีโต ชีเว

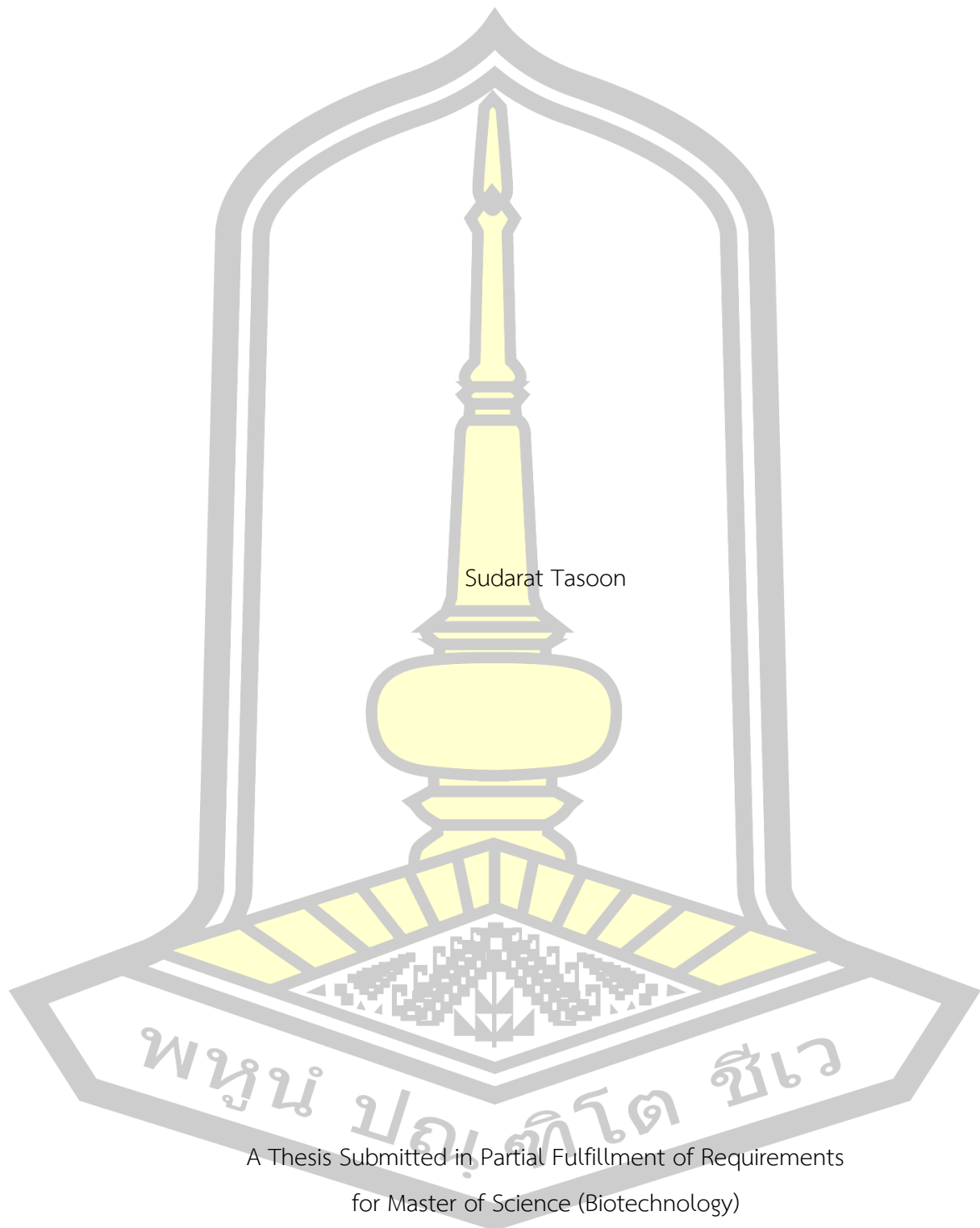
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2566

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Optimization condition for *Cordyceps militaris* cultivation on spent coffee grounds



Sudarat Tagoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

March 2023

Copyright of Maharakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวสุดารัตน์ ทะสุญ
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. พรเทพ ถนนแก้ว)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. ลือชัย บุตคุป)

กรรมการ

(ผศ. ดร. อำภา คนเชื้อ)

กรรมการ

(ดร. อิศราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล)

กรรมการ

(ผศ. ดร. พีรยา โชติถนอม)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ผศ. ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ)

(รศ. ดร. กิริสน์ ชัยมูล)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พูน บุญเกิด ชีวะ

ชื่อเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถึงง่าเข้าสีทองด้วยกากกาแฟ		
ผู้วิจัย	สุตารัตน์ ทะสุญ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ลือชัย บุตคุป		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2566

บทคัดย่อ

กากกาแฟเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการชงกาแฟ ปกติจะนำไปทำปุ๋ยหรือทิ้งเป็นขยะที่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถึงง่าเข้าสีทองด้วยกากกาแฟที่ทำให้ได้ผลผลิต และมีสารออกฤทธิ์สำคัญสูง โดยได้แปรผันปริมาณกากกาแฟในช่วง 0-100% ในอาหารเพาะเลี้ยงให้เกิดดอก พบว่า เติบโตถึงง่าเข้าสีทองที่เพาะเลี้ยงในกากกาแฟที่สัดส่วนที่ 60%-80% ให้ปริมาณสาร คอโรไดเซปินและอะดิโนซีนสูงใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 8069.03, 8759.04 และ 7635.56 mg/kg dw และ 13209.89, 13606.26 และ 9363.92 mg/kg dw ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงถึงง่าเข้าสีทองด้วยข้าวอย่างเดียวนั้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงด้วยสัดส่วนกากกาแฟที่สูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่อการเจริญของดอกเห็ดที่ต่ำลง ดังนั้นกากกาแฟที่สัดส่วนที่ 70% โดยน้ำหนักจึงเหมาะสมที่สุด ที่กากกาแฟที่สัดส่วนที่ 70% โดยน้ำหนักได้ปริมาณสารคอโรไดเซปินและอะดิโนซีนในดอกเห็ดเท่ากับ 8759.04 mg/kg dw และ 13606.26 mg/kg dw ตามลำดับ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 22.46 mg GAE/g dw และ 15.95 mg RU/g dw และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH เท่ากับ 4.00 mg Fe(II)/g dw และ 11.84 mg TE/g dw ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถึงง่าเข้าสีทองโดยใช้วิธีปั่นผิวตบสองและออกแบบการทดลองแบบผสมกลาง ได้แก่ ความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดตัวอย่างกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถึงง่าเข้าสีทองคือ 45% เอธานอล อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างเท่ากับ 60 ml/g และระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 22.50 นาที

คำสำคัญ : ถึงง่าเข้าสีทอง, สารคอโรไดเซปิน, สารอะดิโนซีน, กากกาแฟ

TITLE Optimization condition for *Cordyceps militaris* cultivation on spent coffee grounds

AUTHOR Sudarat Tasoon

ADVISORS Associate Professor Luchai Butkhop , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biotechnology

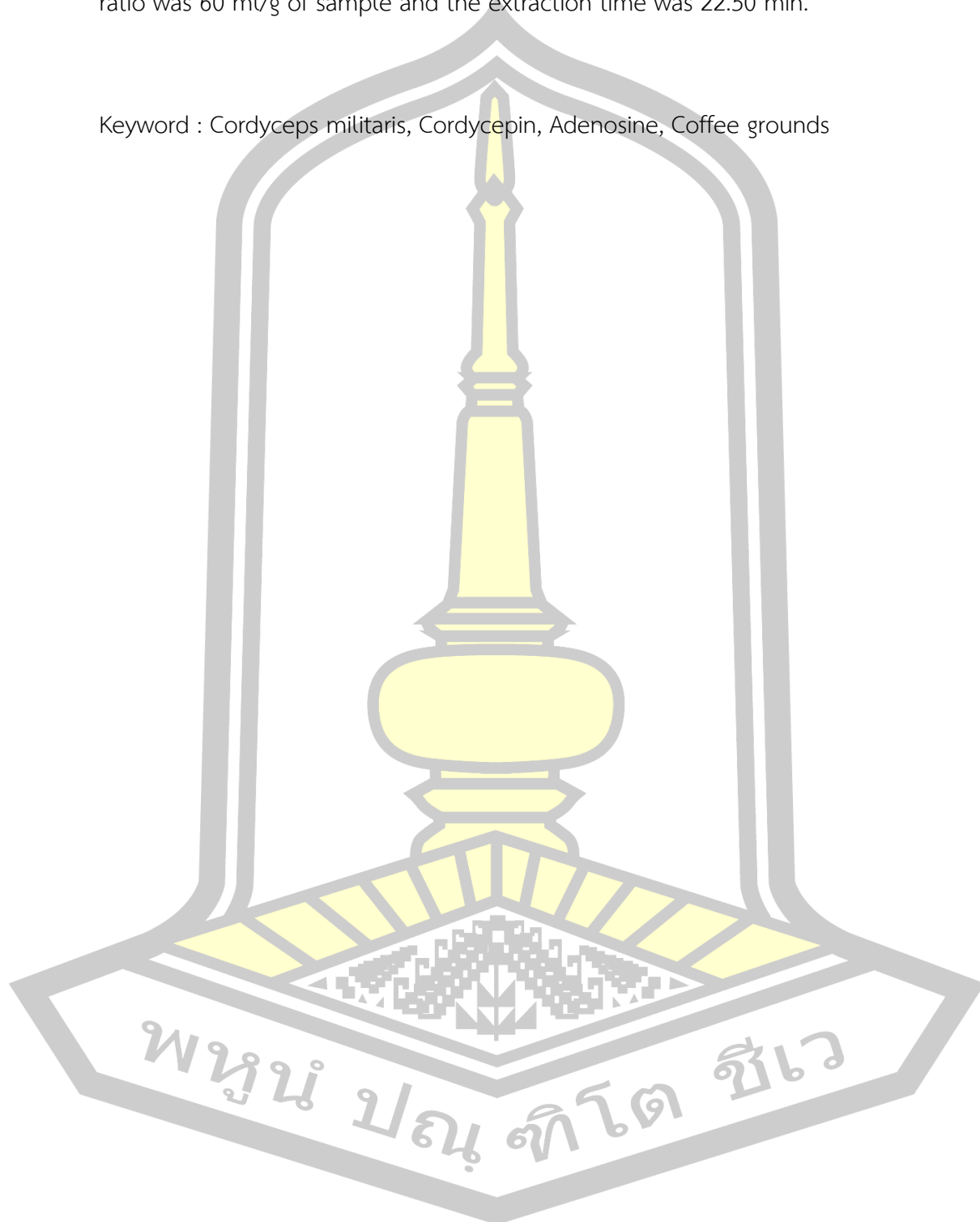
UNIVERSITY Mahasarakham **YEAR** 2023
University

ABSTRACT

Spent coffee grounds are waste products from coffee brewing. Usually used to make fertilizer or dispose of it as a waste that has a negative impact on the environment. The objective of this research was to study the optimum conditions for cultivating the *Cordyceps militaris* with using spent coffee grounds as fruiting body medium that has high yield and abundant active compounds. The spent coffee grounds varying the amount in the range of 0-100% w/w in the culture medium. It was found that the *C. militaris* cultured in spent coffee grounds ranging from 60%-80% had similar high content of cordycepin and adenosine, in the range of 8069.03, 8759.04, 7635.56 mg/kg dry weight and 13209.89, 13606.26, 9363.92 mg/kg dry weight, respectively, which was higher than medium contained only rice. However, cultivation with higher proportion of coffee grounds resulted in lower mushroom growth. Therefore, the proportion of spent coffee grounds at 70% w/w is most optimal medium. The *C. militaris* cultured in 70% w/w had the high content of cordycepin and adenosine with value of 8759.04 and 13606.26 mg/kg dry weight, respectively, total phenolic content and total flavonoids were 22.46 mg GAE/g dw and 15.95 mg RU/g dw, respectively. The antioxidant activity when analyzed by FRAP and DPPH methods were 4.00 mg Fe(II)/g dry weight and 11.84 mg TE/g dry weight, respectively. The response surface methodology and central composite design, e.g. ethanol concentration, liquid and solid ratio and extraction time were used for optimized condition for extraction. The result showed that the optimal extraction conditions for

spent coffee grounds cultured with *C. militaris* were 45% ethanol, the ethanol/sample ratio was 60 ml/g of sample and the extraction time was 22.50 min.

Keyword : Cordyceps militaris, Cordycepin, Adenosine, Coffee grounds



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลือเป็นอย่างสูงจาก ผศ.ดร. ลือชัย บุตุคุป ที่ให้คำปรึกษาตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆตลอดมา ข้าพเจ้าขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่อบรมสั่งสอนคอยให้คำปรึกษา และให้ความรู้แก่ศิษย์

ขอขอบพระคุณบุพการีที่ได้ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดมา คุณค่าและประโยชน์จาก งานวิจัยฉบับนี้ข้าพเจ้าขอมอบบูชาบุพการีและบูรณคณาจารย์ที่ประสาทความรู้

สุตารัตน์ ทะสุญ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กาแฟ (Coffee).....	4
2.1.1 ประวัติ.....	4
2.1.2 เมล็ดกาแฟสายพันธุ์ต่างๆ.....	5
2.1.3 กระบวนการผลิต.....	6
2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการการผลิตกาแฟ.....	8
2.1.5 การใช้ประโยชน์จากกากกาแฟ.....	14
2.2 ถังเช่าสีทอง.....	17
2.2.1 วงจรชีวิตของเห็ดถังเช่า.....	18
2.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดถังเช่า.....	20

2.2.3	เห็นถึงเช่าสีทอง	21
2.3	การศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ และการผลิตสารต่างๆ จากเห็นถึงเช่า	22
2.4	การศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงดอกเห็นถึงเช่าสีทองจากงานวิจัยต่างๆ	26
2.5	แผนการทดลอง Central composite design (CCD)	28
บทที่ 3	วัตถุดิบและวิธีการทดลอง	30
3.1	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็นถึงเช่าสีทองด้วยกากกาแฟ	30
3.1.1	การเตรียมเชื้อเห็น	30
3.1.2	ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงให้เกิดดอก	30
3.1.3	การลงเชื้อและการบ่มเชื้อ	31
3.1.4	การเก็บเกี่ยวผลผลิต	32
3.1.5	การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล	32
3.2	การสกัดตัวอย่าง	33
3.3	การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content)	35
3.4	การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)	36
3.5	การวิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine	36
3.6	การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก	37
3.7	การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	37
3.7.1	การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity)	37
3.7.2	การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	37
3.7.3	การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	38
3.8	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	39
บทที่ 4	ผลการทดลอง	40
4.1	การเจริญของเห็นถึงเช่าสีทอง	40

4.1.1	น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	40
4.1.2	ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และสารอะดีโนซีน (Adenosine).....	41
4.2	สหสัมพันธ์สำหรับทำนายปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง.....	43
4.2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและอัตราส่วนระหว่าง เอธานอลต่อตัวอย่าง.....	45
4.2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและระยะเวลาที่ใช้สกัด.....	47
4.2.3	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างและระยะเวลาในการสกัด	49
4.3	ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และสารอะดีโนซีน (Adenosine).....	51
4.4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และผลการวิเคราะห์ ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content).....	53
4.5	ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ DPPH.....	54
บทที่ 5	สรุปผลการทดลอง.....	55
	ข้อเสนอแนะ.....	56
	บรรณานุกรม.....	58
	ประวัติผู้เขียน.....	65



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการการผลิตกาแฟ.....	8
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	24
ตารางที่ 3 สูตรอาหาร สภาวะในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง (fruiting body) และปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่พบจากงานวิจัยต่างๆ.....	27
ตารางที่ 4 ค่าของ crowde level ใน Central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย	29
ตารางที่ 5 สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าเพื่อให้เกิด Fruiting body.....	31
ตารางที่ 6 ปัจจัยและระดับปัจจัยในการทดลอง.....	34
ตารางที่ 7 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง.....	35
ตารางที่ 8 น้ำหนักดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง (g/ขวด ขนาด 16 ออนซ์) ที่ได้เพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน.....	41
ตารางที่ 9 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และอะดีโนซีน (Adenosine) (mg/g dw) ที่พบในถั่งเช่าสีทองเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน.....	43
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....	45
ตารางที่ 11 สภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ VEAC) ที่ได้จากการทำนายของโปรแกรม.....	51
ตารางที่ 12 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) (mg/kg dw) และอะดีโนซีน (Adenosine) (mg/kg dw) ที่พบในถั่งเช่าสีทองเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน.....	52
ตารางที่ 13 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในถั่งเช่าสีทองที่หมักเลี้ยงด้วยกากกาแฟ.....	54
ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	55

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ผลของกาแฟหรือกาแฟเซอริ	6
ภาพที่ 2 ะการพัฒนาของผลกาแฟ สัดส่วนต่างๆ ของผลกาแฟ ซึ่งผลกาแฟสุกประกอบไปด้วยชั้น ..	7
ภาพที่ 3 กระบวนการผลิตกาแฟคั่วบดและของเสียจากกระบวนการ	8
ภาพที่ 4 ไฮโดรไลซแทนนิน (hydrolyzed tannins)	11
ภาพที่ 5 คอนเดนสแทนนิน (condensed tannins).....	12
ภาพที่ 6 โครงสร้างของกรดแกลลิก (gallic acid).....	13
ภาพที่ 7 โครงสร้างของคาเฟอีน (caffeine)	14
ภาพที่ 8 ลักษณะของถ่านกัมมันต์จากกากกาแฟและประสิทธิภาพการดูดซับ acid orange 7	16
ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟ ที่มา: (อ้างอิงจาก Vardon et al., 2013)	17
ภาพที่ 10 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าที่เบต.....	19
ภาพที่ 11 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ.....	20
ภาพที่ 12 รูปร่าง stromata แบบ capitata	21
ภาพที่ 13 ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง	22
ภาพที่ 14 โครงสร้าง Cordysepin (3'-Deoxyadenosine).....	25
ภาพที่ 15 การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปร	28
ภาพที่ 16 แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็งเมื่อบ่มในที่มืด (ซ้าย).....	40
ภาพที่ 17 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Liquid : Solid ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง.....	46
ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Liquid : Solid ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	

(%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั้ว
 เช่าสีทอง.....47

ภาพที่ 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง
 อิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Extraction time ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของ
 สารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั้วเช่าสีทอง.....48

ภาพที่ 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง
 อิทธิพลร่วม ของ Ethanol concentration และ Extraction time ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH
 (%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วย 48

ภาพที่ 21 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง..49

ภาพที่ 22 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง
 อิทธิพลร่วมของ Liquid : Solid และ Extraction time ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH
 (%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยง.....50



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กาแฟจัดเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมากอย่างหนึ่งของโลก จากประวัติอันยาวนานที่มีต้นกำเนิดจากทวีปแอฟริกาไปสู่ยุโรป และได้แพร่หลายไปยังทั่วทุกมุมโลกผ่านเส้นทางการค้าของโลกยุคอาณานิคม ทำให้มีสายพันธุ์และกรรมวิธีการผลิต การพัฒนาการคั่วและการปรุงกาแฟในสูตรต่างๆ ตามรากฐานทางวัฒนธรรมที่กาแฟได้แทรกตัวเข้าไป

ปัจจุบันธุรกิจร้านกาแฟสดมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากผู้บริโภคหันมาดื่มกาแฟคั่วบดแทนกาแฟผงสำเร็จรูปกันมากขึ้นจึงเป็นธุรกิจที่อยู่ในกระแสความนิยม โดยมีผู้ประกอบการในตลาดมีอยู่หลายกลุ่มทั้งชาวไทยและชาวต่างชาติ ร้านกาแฟสามารถขายกาแฟได้จำนวนแก้วต่อวันเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดของเสียจากขั้นตอนสุดท้ายหลังจากผ่านการชงหรือผ่านน้ำร้อนจากการชงกาแฟเพื่อรีดเอาน้ำของกาแฟออก คือ กากกาแฟ (Spent coffee) ที่บดแล้ว คิดเป็น $45 \pm 10\%$ ของกระบวนการผลิต จะเห็นว่าเศษเหลือทิ้งมากที่สุดคือกากกาแฟ (spent coffee grounds) ซึ่งจากการรวบรวมข้อมูลรายงานพบว่าทั่วโลกจะมีกากกาแฟเหลือทิ้งประมาณ 6 ล้านตันต่อปี (Mussatto, 2011) ส่วนที่เป็นกากกาแฟจะนำไปทิ้งเป็นขยะซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม อีกทั้งยังเป็นสาเหตุของภาวะโลกร้อน การบริหารจัดการที่ดีคือการนำกากกาแฟเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกสีของน้ำตาล ใช้ในการทำน้ำและอากาศให้บริสุทธิ์ ใช้ในการแก้ปัญหา น้ำเสียจากโรงงานย้อมผ้า ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง เป็นต้น และมีการนำกากกาแฟมาใช้ประโยชน์อื่นๆ อีกหลายด้าน

ประชาชนในปัจจุบันหันมาใส่ใจสุขภาพ ปฏิเสธสารเคมี สารพิษ และมลพิษต่างๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าคนบางกลุ่มได้นำกากกาแฟ มาผลิตเป็นครีมขัดผิว เจลขัดผิว และผงขัดผิว เพราะจากข้อมูลที่กำลังกล่าวถึงคุณสมบัติของกากกาแฟนั้น เป็นแหล่งรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยขับสารพิษให้ออกจากผิวรวมทั้งเร่งให้เกิดการผลิตเซลล์ผิวเก่าออกไป นอกจากนี้ในกาแฟมีสารคาเฟอีนซึ่งเมื่อถูกนำมาแปรรูปเป็นสครับกาแฟแล้ว จะมีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ไขมันชั้นผิวเกิดการแตกตัวช่วยจัดการกับไขมันส่วนเกินป้องกันไม่ให้เกิดอาการผิวเปลือกส้ม หรือเซลลูไลท์ (Cellulite) ได้ อย่างไรก็ตามการนำไปใช้หากจะเพิ่มมูลค่าให้ได้มากกว่าสครับกาแฟขัดผิวมีความเป็นไปได้ในการนำกากกาแฟมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และเพื่อเป็นการช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ การใช้เอนไซม์จากเห็ดราจะช่วยให้โครงสร้างของสารออกฤทธิ์สำคัญในกากกาแฟซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปโครงสร้างที่ซับซ้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มแทนนินมีโครงสร้างที่เล็กลง การสกัดเพื่อใช้

ประโยชน์จะทำให้สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น ซึ่งจากการสังเกตพบว่ากากกาแฟเหล่านี้เมื่อวางทิ้งไว้ตามธรรมชาติจะมีเชื้อราเกิดขึ้นจำนวนมาก จึงคาดว่ากากกาแฟสดน่าจะมีศักยภาพในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเชื้อราได้ดีเช่นกัน เพื่อให้กากกาแฟเหลือทิ้งเหล่านี้มีมูลค่าเพิ่มและเกิดการใช้ประโยชน์ได้ในทุกส่วนของกระบวนการผลิตกาแฟซึ่งเป็นตัวอย่างและแนวทางส่งเสริมระบบการผลิตของอุตสาหกรรมเกษตรได้อย่างยั่งยืนจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยถึงการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟเหลือทิ้งเหล่านี้สำหรับเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อราซึ่งนอกจากจะได้ผลผลิตหลักคือดอกถั่งเช่าสีทองที่มีราคาสูงแล้ว จะได้กากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงสำหรับนำไปสกัดสารออกฤทธิ์เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไปได้

โครงการวิจัยนี้จะช่วยสร้างมูลค่าให้กับกากกาแฟซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการชงกาแฟ สร้างอาชีพแก่เกษตรกรผู้ปลูกและแปรรูปกาแฟ ตลอดจนเกิดเครือข่ายระหว่างนักวิจัยและเกษตรกร ส่งผลดีต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศให้ประเทศมีความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืน ตามหลักปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง ตอบสนองยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี ประเด็นยุทธศาสตร์ชาติด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขันกลุ่มอุตสาหกรรมและบริการแห่งอนาคต กลุ่มเรื่องย่อยอุตสาหกรรมชีวภาพที่มีมูลค่าเพิ่มสูงในการผลิตเวชสำอางและสารสกัดสมุนไพร จัดอยู่ในกรอบวิจัยเรื่อง วิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ ทรัพยากรชีวภาพ และทรัพยากรพันธุกรรมชนิดใหม่ในทุกระดับโดยคำนึงถึงความยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพในธรรมชาติ กลุ่มเรื่องที่ 15 การพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานความหลากหลายทางชีวภาพ วิจัยเพื่อพัฒนากลุ่มธุรกิจฐานความหลากหลายทางชีวภาพที่มีศักยภาพของประเทศ ตลอดจนการเพิ่มมูลค่าของชีวมวลท้องถิ่นในเชิงพาณิชย์ การสกัดสารเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์และสามารถพัฒนาเพื่อการแข่งขันในระดับชาติและ/หรือระดับนานาชาติ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยกากกาแฟที่ทำให้ได้ผลผลิต และมีสารออกฤทธิ์สำคัญสูง

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากฐานถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการใช้กากกาแฟเป็นอาหารเลี้ยง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยกากกาแฟที่ทำให้ได้ผลผลิต และมีสารออกฤทธิ์สำคัญสูง

1.3.2 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากฐานถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการใช้กากกาแฟเป็นอาหารเลี้ยง

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1.4.1 ทราบสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองด้วยกากกาแฟที่ทำให้ได้ผลผลิตและมีสารออกฤทธิ์สำคัญสูง

1.4.2 ทราบสถานะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญจากฐานถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการใช้กากกาแฟเป็นอาหารเลี้ยง



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กาแฟ (Coffee)

2.1.1 ประวัติ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ทำจากเมล็ดกาแฟคั่ว ซึ่งได้จากต้นกาแฟ นิยมดื่มร้อนๆ แต่สามารถดื่มแบบเย็นได้ บางครั้งนิยมใส่นมหรือครีมลงในกาแฟด้วย ในกาแฟหนึ่งถ้วยมีคาเฟอีนอยู่ประมาณ 80-140 มิลลิกรัม เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในโลกชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับชาและน้ำ กาแฟเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณทวีปแอฟริกา เชื่อว่าถูกค้นพบครั้งแรกโดยเด็กเลี้ยงแพะชาวอาบิสซีเนีย (ประเทศเอธิโอเปียในปัจจุบัน) ชื่อคาลดี จากการสังเกตพบว่า แพะดูกระปรี้กระเปร่าขึ้นเมื่อกินผลไม้สีแดงของต้นไม้อันหนึ่ง ซึ่งก็คือต้นกาแฟ ในช่วงศตวรรษที่ 16 กาแฟถูกปลูกโดยชาวอาหรับเท่านั้น คำว่ากาแฟ เป็นคำที่มาจากคำว่า “เกาะหะหะ” ในภาษาอาหรับ แล้วเพี้ยนเป็น กาท์ เวย์ ในภาษาตุรกี ก่อนที่จะกลายเป็น คอฟฟี่ ในภาษาอังกฤษ และกาแฟในภาษาไทย ชาวอาหรับหวังแทนพันธุกาแฟมาก จึงส่งออกเฉพาะเมล็ดกาแฟที่คั่วสุกแล้วเท่านั้น แต่เมล็ดกาแฟถูกลักลอบนำออกมาโดยชาวอินเดียที่ไปแสวงบุญที่เมกกะ และได้แพร่ขยายไปยังชวา เนเธอร์แลนด์ และทั่วยุโรป ในที่สุด สำหรับทวีปอเมริกานั้น ต้นกาแฟถูกนำไปอย่างยากลำบาก โดยทหารเรือฝรั่งเศสในต้นศตวรรษที่ 18 ในครั้งแรกนั้น มีต้นกาแฟที่เหลืรอดชีวิตบนเรือมาขึ้นฝั่งอเมริกาได้เพียง 1 ต้น และได้แพร่ขยายเพิ่มขึ้น จนปัจจุบันดินแดนแห่งนี้ได้กลายเป็นดินแดนที่ปลูกต้นกาแฟมากที่สุดในโลก

กาแฟ ถือได้ว่าเป็นสินค้าที่มีการซื้อขายมากที่สุดเป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากน้ำมันปิโตรเลียม ปัจจุบันวัฒนธรรมการกินกาแฟกำลังพัฒนากันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็น กาแฟสำเร็จรูป จากภาคอุตสาหกรรม กาแฟสด จากร้านกาแฟ หรือแม้กระทั่งจากในครัวเรือน สำหรับประเทศไทยเองกระแสการบริโภคกาแฟกำลังเป็นที่จับตามอง มูลค่าของอุตสาหกรรมกาแฟในประเทศไทยในปี 2561 สูงถึง 17,000 ล้านบาท มีการผลิตกาแฟ 20,000 ตันต่อปี แต่ไม่เพียงพอต่อการบริโภค ซึ่งสูงถึง 120,000 ตันต่อปี และโดยเฉลี่ยแล้วคนไทยบริโภคกาแฟราว 0.5- 1.0 กิโลกรัมต่อปี ถือเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสหรัฐอเมริกา 3.5 กิโลกรัมต่อปี และกลุ่มประเทศสแกนดิเนเวีย 10 กิโลกรัมต่อปี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าตลาดการบริโภคกาแฟของไทยยังสามารถเติบโตขึ้นได้ โดยมีการคาดการณ์ไว้ว่า ภายในปี 2565 จะมีการบริโภคกาแฟในประเทศไทยสูงถึง 300,000 ตันต่อปี

2.1.2 เมล็ดกาแฟสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์กาแฟนั้นมีอยู่มากมายหลายสายพันธุ์ แต่ที่รู้จักกันโดยทั่วไปจะมีอยู่ 4 สายพันธุ์ ได้แก่

- 1) กาแฟอาราบิก้า (Arabica)
- 2) กาแฟโรบัสต้า (Robusta)
- 3) กาแฟเอ็กซ์เซลซ่า (Excelsa)
- 4) กาแฟลิเบอริก้า (Liberica)

ซึ่งสายพันธุ์กาแฟลิเบอริก้าและกาแฟเอ็กซ์เซลซ่า ไม่นิยมปลูกเพื่อการค้าเนื่องจากรสชาติไม่ค่อยดีนัก แต่สายพันธุ์กาแฟที่มีการบริโภคหลักๆ มีอยู่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ กาแฟอาราบิก้า ซึ่งเป็นกาแฟแบบดั้งเดิม และมีรสชาติดี และ กาแฟโรบัสต้า ซึ่งมีปริมาณคาเฟอีนสูง และสามารถปลูกในพื้นที่ที่ไม่สามารถปลูกกาแฟอาราบิก้าได้ ด้วยความที่มีความทนทานมากกว่านี้เอง จึงทำให้กาแฟโรบัสต้ามีราคาถูกกว่ากาแฟอาราบิก้า แต่ผู้คนไม่ค่อยนิยมดื่มมากนักเนื่องจากมีรสขมและเปรี้ยว ส่วนโรบัสต้าที่มีคุณภาพดีจะถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมของเอสเพรสโซ่แบบผสม (เอสเพรสโซ่มี 2 แบบใหญ่ๆ คือ แบบที่เป็นอาราบิก้าแท้ๆ กับแบบที่ผสมกาแฟชนิดอื่นๆ)

ในประเทศไทยนั้นมีการปลูกกาแฟกันมากในพื้นที่ภาคเหนือและภาคใต้ โดยมีการกล่าวไว้ว่าประเทศไทยมีการนำพันธุ์กาแฟอาราบิก้าเข้ามาปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 และมีโครงการส่งเสริมการปลูกเพื่อทดแทนการปลูกฝิ่นในเขตภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่และเชียงรายมีการพัฒนาต่อเนื่อง ส่วนวัฒนธรรมการดื่มกาแฟนั้นเริ่มขึ้นในสมัยรัชกาลที่ 6 โดยโปรดเกล้าให้ตั้งร้านกาแฟชื่อนรสิงห์ ขึ้น ณ บริเวณริมถนนศรีอยุธยา ริมลานพระบรมรูปทรงม้าและต่อมามีการตั้งร้านกาแฟขึ้นอีกหลายร้าน ในปัจจุบัน ธุรกิจร้านกาแฟสดเกิดขึ้นมากมายตามทั่วภูมิภาคของประเทศ (รพีพรรณ กองตุม, 2560) ซึ่งกาแฟเป็นเครื่องดื่มที่สำคัญที่นิยมดื่มกันมากในตอนเช้าและตอนบ่าย เพื่อเพิ่มความกระปรี้กระเปร่าแก่ร่างกาย โดยประมาณประชากรของโลกจะบริโภคกาแฟวันละ 1,000 ล้านถ้วยเป็นอย่างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องดื่มชนิดอื่น เช่น ชา หรือเครื่องดื่มบรรจุขวดแล้ว อาจถือว่างาแฟเป็นเครื่องดื่มที่นิยมเป็นอันดับหนึ่งก็ว่าได้ กาแฟถูกนำมาเป็นเครื่องดื่มบนโต๊ะอาหารตอนเช้าของชาวยุโรปและอเมริกาเมื่อหลายศตวรรษที่ผ่านมา ต่อมาได้แพร่หลายมายังเอเชีย และมีส่วนทำให้การบริโภคพืชเครื่องดื่มอื่น เช่น ชา ลดน้อยลง การที่กาแฟถูกนำมาเป็นพืชเครื่องดื่มในกิจการดังกล่าวนี้ เนื่องจากสารประกอบในกาแฟซึ่งเรียกว่า คาเฟอีน (Caffein) สามารถกระตุ้นประสาทของมนุษย์ให้ตื่นตัวและกระปรี้กระเปร่า การบริโภคกาแฟได้เปลี่ยนแปลงและพัฒนามาโดยตลอดจากการนำเอาเมล็ดกาแฟที่คั่วให้สุก นำมาต้มแล้วกรองเอากากออก จนมาถึงกระบวนการจัดทำเป็นกาแฟสำเร็จรูป (Instant Coffee) ซึ่งสามารถชงละลายได้หมดโดยไม่ต้องมีการกรองเอากากกาแฟออกทิ้ง ต่อมาอุตสาหกรรมการผลิตกาแฟได้เอากาแฟมาผสมกับสิ่งอื่นเพื่อสร้างรสชาติ (Flavour) กลิ่น (Aroma)

และความกลมกล่อม ให้เป็นที่ถูกใจผู้บริโภคมากขึ้น สิ่งเจือปนหรือส่วนผสมอื่นๆนั้น ได้แก่ ถั่ว ข้าวโพดหรือพืชหัวชนิดหนึ่งคล้ายหัวผักกาดซึ่งเรียกว่า ชิโครี (Chicory) สำหรับในประเทศไทยนิยม ผสมกับเมล็ดมาขามและข้าวโพด เป็นต้น

เมล็ดกาแฟนั้นเป็นเมล็ด (seed) ของผลกาแฟ ถูกเรียกว่า Bean (บีนส์) นั้นเนื่องจาก มีลักษณะคล้ายคลึงกัน

ผลกาแฟ หรือเชอร์รี่กาแฟ นั้นจะมีรูปร่างหน้าตาและสีแตกต่างกันไปตามชนิดของต้นกาแฟ เช่น ต้นกาแฟบางชนิดอาจจะมีผลเชอร์รี่ทรงรีและมีสีแดง หรือ สีเหลืองทรงกลม (รูปที่ 1) โดยทั่วไปแล้วภายในของเชอร์รี่กาแฟจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้นมีหน้าที่แตกต่างกัน ภายในผลของเชอร์รี่กาแฟประกอบไปด้วยเมล็ดกาแฟ 2 เมล็ด ประกบติดกันโดยเมล็ดทั้งสองมีเมือก (mucilage) และหุ้มด้วยเปลือกชั้นใน (silverskin) ห่อหุ้มอยู่อีกชั้นหนึ่ง (Patricia and Victor, 2012) (รูปที่ 2)

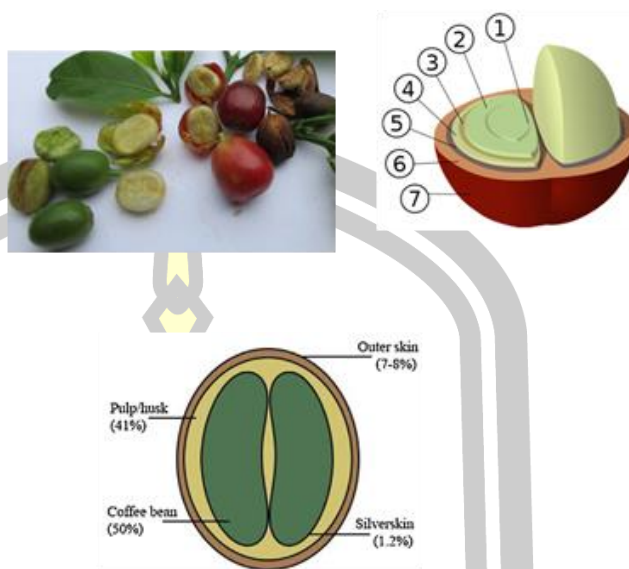


ภาพที่ 1 ผลของกาแฟหรือกาแฟเชอร์รี่

ที่มา: <https://theweekendedition.com.au/food-drink/coffee-cherry-beer/>

2.1.3 กระบวนการผลิต

ปัจจุบันตลาดกาแฟในประเทศไทยประเภทกาแฟคั่ว-บด มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ตามลำดับโดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกกาแฟมากขึ้น มีการส่งเสริมการปลูกกาแฟพันธุ์โรบัสต้าที่สามารถสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ และเป็นธุรกิจที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน ซึ่งก่อให้เกิดกลุ่มธุรกิจผลิตกาแฟขนาดย่อมขึ้น (SME) หลายกลุ่ม เมล็ดกาแฟดิบที่เป็นวัตถุดิบผลของกาแฟมีลักษณะค่อนข้างกลม ขณะที่ยังเป็นผลอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดงสดคล้ายเชอร์รี่จึงสามารถเรียกอีกอย่างได้ว่า กาแฟเชอร์รี่



ภาพที่ 2 ระบุว่าพัฒนาของผลกาแฟ สีสันต่างๆ ของผลกาแฟ ซึ่งผลกาแฟประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ คือ 1) รอยแยกกลางเมล็ด (center cut); 2) เมล็ด (endosperm); 3) เยื่อหุ้มเมล็ด (silver skin หรือ spermoderm); 4) ผนังผลชั้นในหรือกะลา (parchment หรือ endocarp); 5) เมือกหุ้ม (pectin layer/mucilage หรือ inner mesocarp); 6) ผนังผลชั้นกลางหรือเนื้อ (pulp หรือ mesocarp); 7) เปลือก (outer skin หรือ exocarp)

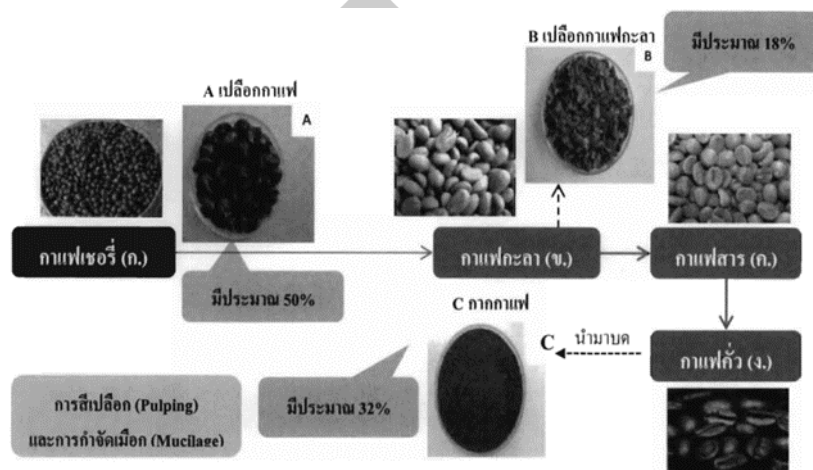
ที่มา: Janissen และ Huynh (2018)

กระบวนการผลิตกาแฟคั่วบดมีขั้นตอนไม่มากนัก (รูปที่ 3) หลังจากที่ตัดสรรผลกาแฟเป็นอย่างดีแล้ว จะเข้าสู่กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ หรือบางครั้งเรียกว่ากาแฟสาร ซึ่งแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1. การผลิตวิธีแห้ง (dry processing) ผลกาแฟจะถูกนำไปตากแดดจนแห้งสนิท จนกระทั่งความชื้นของผลกาแฟเหลืออยู่ไม่เกินร้อยละ 12 จึงจะนำมาเข้าสู่กระบวนการกะเทาะเปลือกจนได้เมล็ดกาแฟและนำไปทำความสะอาดด้วยการใช้ลมเป่า

2. การผลิตด้วยวิธีเปียก (wet processing) ผลกาแฟหลังจากเก็บเกี่ยวจะถูกนำมาปอกเปลือกด้านนอกออกด้วยเครื่องปอกเปลือกทันที ของเสียจากกระบวนการนี้คือเปลือกกาแฟ (coffee pulp) ที่มีมากกว่าร้อยละ 50 ขั้นตอนนี้ต้องทำภายใน 24 ชั่วโมง ป้องกันการเกิดการหมักของกาแฟ ซึ่งจะทำให้กาแฟมีกลิ่นและรสชาติที่เปลี่ยนไป หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำเป็นเวลาอย่างน้อย 2-3 วัน เพื่อกำจัดเมือก (mucilage) และควรเปลี่ยนน้ำอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำไปตากแห้งกลางแจ้งได้กาแฟกะลาสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน หากต้องการกาแฟคั่วบดจะนำกาแฟกะลามาสีเปลือกออก กาแฟกะลามีลักษณะคล้ายข้าวเปลือก กระบวนการนี้จะมีของเสียคือ เปลือกกาแฟกะลา (coffee husk) คิดเป็นร้อยละ 18 และขั้นสุดท้ายคือ เมื่อนำกาแฟสารไปคั่ว ขงขายเป็นกาแฟสดพร้อมดื่มตามร้านขายกาแฟ

สดทั่วไป เกิดของเสียจากขั้นตอนสุดท้ายคือ กากกาแฟ (Spent Coffee) ที่บดแล้ว คิดเป็น $45 \pm 10\%$ ของกระบวนการผลิต



ภาพที่ 3 กระบวนการผลิตกาแฟคั่วบดและของเสียจากกระบวนการ
ที่มา : <https://gsbooks.gs.kku.ac.th/58/the34th/pdf/PMP8.pdf>

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการการผลิตกาแฟ

ส่วนที่เหลือทิ้งจากกระบวนการการผลิตกาแฟ ได้แก่ เปลือกกาแฟ (coffee husk) กากกาแฟ (coffee pulp) และเมล็ดกาแฟที่ผ่านการบดแล้ว (coffee spent ground) ซึ่งแต่ละส่วนมีองค์ประกอบทางเคมีดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการการผลิตกาแฟ

องค์ประกอบ	เปลือกกาแฟ (coffee husk)	กากกาแฟ (coffee pulp)	เมล็ดกาแฟที่ผ่านการบดแล้ว (spent coffee ground)
โปรตีน	9.2-11.3	8.5-12.1	10.3-12.2
ไขมัน	2.0-2.3	1.5-2.0	15.2-17.9
เซลลูโลส	13.2-27.6	1.5-2.0	13.2-18.4
ซีกา	3.3-4.1	5.5-6.8	4.5-6.3
ไนโตรเจน	57.8-66.1	45.5-54.3	41.0-49.8
แทนนิน	4.5-5.4	1.8-2.4	1.2-1.5
คาเฟอีน	0.8-1.1	0.5-0.7	0.02-0.08

ที่มา : Fan และ Soccol, 2005

1) โพลีแซคคาไรด์ เป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ที่เป็นชนิดเดียวกัน (homopolysaccharide) เช่น เซลลูโลสหรือต่างชนิดกัน (heteropolysaccharide) หรือเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เช่น กาแล็กโทแมนแนน (galactomannan) และอะราบินอกาแล็กแทน (arabinogalactan) เป็นต้น โดยในกากกาแฟประกอบไปด้วยโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 2 ประเภท ประมาณร้อยละ 50 ต่อน้ำหนักแห้งกากกาแฟ ซึ่งจะพบ กาแล็กโทแมนแนนมากที่สุด การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากกากกาแฟจะใช้วิธีการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยกรด ตัวอย่างเช่น การใช้กรดซัลฟูริก 72 %w/w อัตราส่วนสารละลายกรดต่อกากกาแฟ 5 mL/g อุณหภูมิ 50°C เวลาสกัด 7 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อเจือจางสารละลายให้เหลือกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 N และบ่มตัวอย่างต่อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 45 นาที เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าในกากกาแฟประกอบไปด้วยเซลลูโลส 8.6 %w/w เฮมิเซลลูโลส 36.7 %w/w ซึ่งประกอบด้วย แมนโนส กาแล็กโทส และอะราบินอส 21.2, 13.8 และ 1.7% w/wตามลำดับ (Mussatto, 2011) หรือการไฮโดรไลต์ด้วยด่าง (4 M NaOH) โดยการนำกากกาแฟมาให้ความร้อน (roasted) ที่อุณหภูมิ 160-220°C และนำไปสกัดทันทีที่อุณหภูมิ 60°C ซึ่งการให้ความร้อนกากกาแฟก่อนการสกัดนี้จะช่วยให้ได้ร้อยละของโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจากเดิมถึงร้อยละ 15 (Simões et al., 2013) ในปัจจุบันเทคนิคการสกัดได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเรื่อยๆ โดยมีการใช้เทคโนโลยีเข้ามาช่วย เช่น การใช้เทคนิคการสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave assisted extraction) โดยมีน้ำและอุณหภูมิเป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดแทนการใช้สารละลายกรดและด่าง พบว่าได้ร้อยละผลผลิตของกาแล็กโทส และแมนโนสสูงถึง 74 และ 66 %w/w ตามลำดับ และเมื่อสกัดอย่างต่อเนื่อง พบว่าได้ปริมาณเซลลูโลสมากถึง 84% (Passus et al., 2013) เป็นต้น

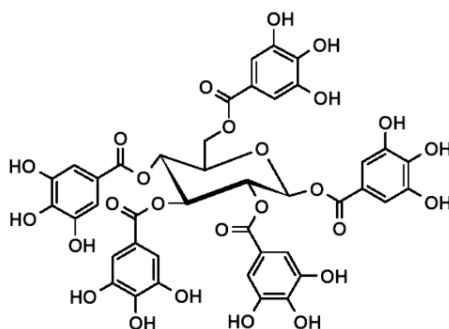
2) โปรตีน ในกากกาแฟจะมีปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ยที่ 13.6% w/w จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ซึ่งเป็นวิธีคำนวณจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าในกากกาแฟยังมีโปรตีนเหลืออยู่ร้อยละ 13.6 ต่อน้ำหนักกากกาแฟแห้ง ทั้งนี้ค่าที่ได้อาจมากกว่าความเป็นจริงเล็กน้อยจากปริมาณไนโตรเจนที่มาจากส่วนของคาเฟอีน ไตรโกเนลลีน (trigonelline), เอมีนอิสระ (free amine) และกรดอะมิโน (Mussatto et al., 2011) นอกจากโปรตีนแล้วในกากกาแฟยังมีกรดอะมิโนอีกหลายชนิด จากรายงานพบมากถึง 17 ชนิด โดยที่ลิวซีน (leucine) วาลีน (valine) และฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) จะพบปริมาณมากที่สุด ค่าเฉลี่ยอยู่ประมาณ 10.6-10.9, 6.0-6.8 และ 0.5-6.7 (%protein) ตามลำดับ ซึ่งบางชนิดยังพบมากกว่าในถั่วเหลือง เป็นต้น (Campos-Vega et al., 2015)

3) ไขมัน ปริมาณน้ำมันที่มีในกากกาแฟจะอยู่ในช่วง 11-20 %w/w โดยเฉลี่ยจะอยู่ที่ประมาณ 15 %w/w การสกัดน้ำมันจากกากกาแฟ เริ่มต้นด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เฮกเซน อีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน โดยวิธีการรีฟลักซ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน กากกาแฟ : ตัวทำ

ละลาย 100 g : 300 mL พบว่าร้อยละของน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน อีเทอร์ และไดคลอโรมีเทน เท่ากับ 13.4, 14.6 และ 15.2 %w/w โดย pH ของน้ำมันที่ได้เท่ากับ 6.8, 4.7 และ 4.5 ตามลำดับ ดังนั้นเฮกเซนจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่า pH ของน้ำมันที่สกัดได้เป็นกลางเหมาะกับการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ มากที่สุด (Kondamudi et al., 2008) การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อาจส่งผลกระทบต่อทั้งคุณภาพของน้ำมันและที่สำคัญส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในปัจจุบันมีจึงการใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหล (fluid carbon dioxide) โดยควบคุมความดันและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด เช่น ที่ความดัน 25 MPa อุณหภูมิ 323 K เวลา 3 ชั่วโมง ได้น้ำมันสูงสุด 15.4 %w/w และหากใช้ร่วมกับเอทานอล พบว่า ได้ร้อยละของน้ำมันสูงสุดถึง 19 %w/w โดยที่สามารถลดเวลาในการสกัดลงได้ถึง 3 เท่า เป็นต้น (Al-Hamamre et al., 2012)

4) แทนนิน (tannin) เป็นสารประกอบพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 500 ถึง 3,000 กิโลดาลตัน สามารถพบแทนนินในสวนต่างๆ ของพืช อาทิเช่น เปลือก แกน เมล็ด และดอก คุณสมบัติที่สำคัญของแทนนินที่แตกต่างจากสารโพลีฟีนอลชนิดอื่น คือ แทนนินสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน และโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ เช่น แป้ง เซลลูโลส และแร่ธาตุต่างๆ (Mueller-Harvey et al., 1987; Lekha and Lonsane, 1997; Aguilar and Gutierrez-Sanchez, 2001) จากลักษณะทางโครงสร้างและคุณสมบัติของแทนนิน สามารถแบ่งแทนนินได้เป็น 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolyzed tannins) และคอนเดนสแทนนิน (condensed tannins)

- ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolyzed tannins) เป็นอนุพันธ์ของกรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งเกิดจากการที่กรดแกลลิก สร้างพันธะเอสเทอร์ล้อมรอบน้ำตาลแอลกอฮอล์ โดยจะไฮโดรไลซ์แทนนินเป็นโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรไลซ์แทนนิน ซึ่งสารชนิดนี้เกิดจากการสร้างพันธะเมตาเดไซด์ (meta deposite) ระหว่างหมู่แกลลอยล (galloyl) กับหมู่ไฮดรอกซิลของฟีนอลิกแกลลอยล (phenolic galloyl-OH groups) และมีน้ำตาลกลูโคส เป็นแกนกลางของโครงสร้าง (รูปที่ 4) เมื่อถูกกรดหรือเอนไซม์แทนเนสย่อยสลายจะได้กรดแกลลิกกับกลูโคส (Haslam and Tanner, 1970; Niehaus and Gross, 1997)



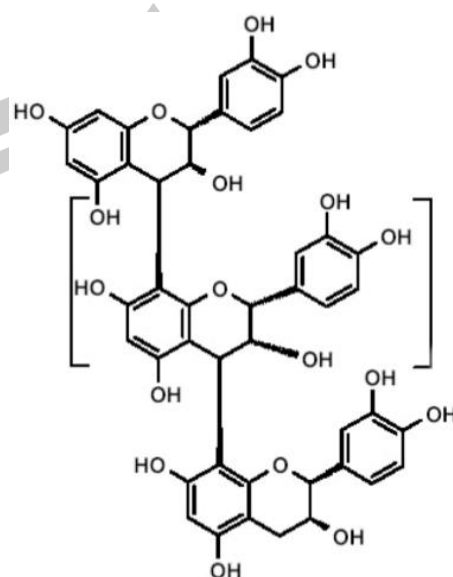
ภาพที่ 4 ไฮโดรไลสแทนนิน (hydrolyzed tannins)

ที่มา : Albertse, 2002

ไฮโดรไลสแทนนินพบได้ทั้งในพืชและไฮโดรไลสแทนนินบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปทางการค้า ซึ่งแทนนินชนิดนี้นิยมใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการการผลิตเอนไซม์แทนเนส (Battestin and Macedo, 2007) หรือใช้ไฮโดรไลสแทนนินที่พบในพืช ตัวอย่างเช่น เปลือกกาแฟ (Ayuman and Hanmoungjai, 2006; Sabu et al., 2006) เมล็ดมะขาม เนื้อปาล์ม (Sabu et al., 2006) และสมอไทย (Banerjee et al., 2005) เป็นต้น

- คอนเดนสแทนนิน (condensed tannins) หรือ โพรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) ประกอบด้วยสารจำพวกฟีนอลที่เรียกว่า ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ฟลาโวลาน (flavolan) ตัวอย่างเช่น คาเทชิน (catechin) หรือ ฟลาวัน-3,4-ไดโอล (flavan-3,4-diol) โดยเมื่อกาเทชินถูกย่อยสลายแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ อีพิกาทะชิน (epicatechin) กับกรดแกลลิก ความแตกต่างที่เห็นได้ชัดระหว่างคอนเดนสแทนนินกับไฮโดรไลสแทนนิน คือ โครงสร้างของคอนเดนสแทนนินจะไม่มีน้ำตาลแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 5) (Haggerman and Butler, 1978; Albertse, 2002)

พหุ ประ โท ชี เว

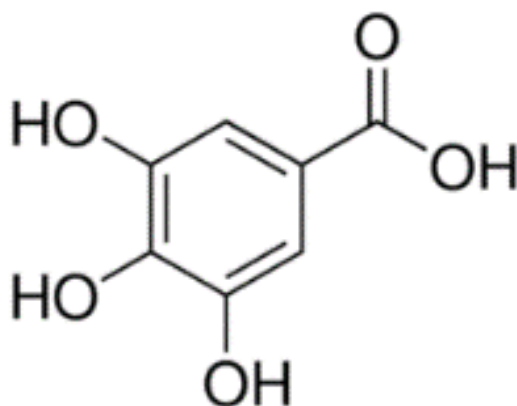


ภาพที่ 5 คอนเดนสแทนนิน (condensed tannins)

ที่มา : Albertse, 2002

- กรดแกลลิก (gallic acid) or (3,4,5-trihydroxy benzoic acid) เป็นสารประกอบฟีนอล (ภาพที่ 6) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการย่อยสลายแทนนินโดยกระบวนการทางเคมี หรือทางชีวภาพ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหลายๆ ด้าน อาทิ อุตสาหกรรมการผลิตสี (น้ำหมึกสำหรับเขียนหมึกสำหรับภาพถ่าย) อุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมหนังสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตชา และอุตสาหกรรมสารเคมี เป็นต้น (Hadi et al., 1994; Mukharjee and Banerjee, 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตยาไตรเมโทพริม (trimethoprim; TMP) ซึ่งเป็นสารต้านแบคทีเรียที่ใช้ร่วมกับยาซัลโฟนาไมด์ รวมถึงอุตสาหกรรมการเครื่องหนัง การผลิตสารเอสเทอร์ของกรดแกลลิก (โพรพิลแกลเลท ไพโรแกลลอยด์) เป็นต้น (Hadi et al., 1994; Mukharjee and Banerjee, 2003)

พหุ ประ โท ชีวะ

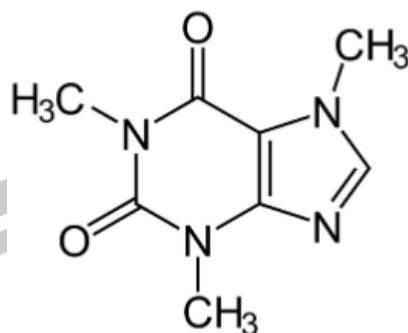


ภาพที่ 6 โครงสร้างของกรดแกลลิก (gallic acid)

ที่มา :<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7384?lang=en®ion=TH>

5) คาเฟอีน (caffeine) จัดเป็นสารที่สำคัญและเป็นเอกลักษณ์ของกาแฟ (ภาพที่ 7) โดยในกาแฟจะพบปริมาณคาเฟอีนเหลืออยู่ในช่วง 0.73-41.3 ug/mg กาแฟสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลาย เช่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล โดยเทคนิค ultrasound และ soxhlet ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคขั้นสูงในการสกัดหรือสกัดเช่นเดียวกับน้ำมัน คือ การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหลที่ความดัน 300 bar อุณหภูมิ 58.5°C ทำให้ได้ปริมาณคาเฟอีน 41.3 ug/mg กาแฟ มากกว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นในอุตสาหกรรมผลิตกาแฟจึงนิยมใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของไหลในกระบวนการ decaffeinate ในการผลิตกาแฟที่ปราศจากคาเฟอีนเป็นต้น (Campos-Vega et al., 2015)

พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 7 โครงสร้างของคาเฟอีน (caffeine)

ที่มา : <https://www.redbubble.com/people/bothot/works/25559651>

2.1.5 การใช้ประโยชน์จากกากกาแฟ

ในระยะเริ่มต้นกากกาแฟที่เหลือทิ้งจะถูกนำมาใช้เพื่อเป็นปุ๋ยให้กับต้นไม้ แต่ในปัจจุบันด้วยปริมาณที่เพิ่มขึ้นประกอบกับการศึกษาวิจัยที่พบว่า การใช้กากกาแฟเพื่อเป็นปุ๋ยลงไปในพื้นที่โดยตรงนั้นส่งผลต่ออัตราการงอกและการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของคาเฟอีนที่เหลืออยู่ในกากกาแฟนั้น (Hardgrove and Livesley, 2016) ดังนั้นในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟจึงเน้นไปที่การสกัดสารสำคัญไปใช้ประโยชน์ หรือการปรับสภาพเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีและทางกายภาพของกากกาแฟก่อนนำไปใช้ ซึ่งสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 ด้านหลัก ๆ คือ ด้านอาหารและสุขภาพ ด้านพลังงาน และด้านเกษตรสิ่งแวดล้อม

1) ด้านอาหารและสุขภาพ

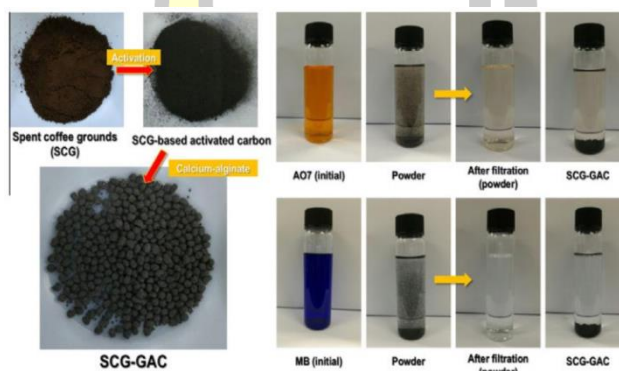
หัวใจสำคัญของการผลิตอาหารนอกจากความสะอาดและรสชาติเป็นที่ชื่นชอบแล้ว คุณค่าทางโภชนาการก็สำคัญไม่น้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารปัจจุบัน โดยเฉพาะอาหารแข็ง เช่น ขนมปัง (biscuit) ก็ได้เล็งเห็นประโยชน์จากกากกาแฟ จึงได้มีการศึกษาการใช้กากกาแฟเป็นส่วนผสมในขนมปังอัตราส่วน 4% w/w พบว่าขนมปังที่ได้ยังคงลักษณะและรสชาติเป็นปกติ แต่สามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้จากสารต้านอนุมูลอิสระ โยอาหาร โปรตีน และกรดอะมิโนที่มีอยู่ในกากกาแฟได้ (Martinez-Saez et al., 2017) สารโพลีแซคคาไรด์ที่มีมากในกากกาแฟก็เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะกาแล็กโทแมนแนน ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถกระจายตัวในน้ำเย็นได้ ทำให้สารละลายมีความข้นหนืด และเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด สารเพิ่มความคงตัว และสารยึดติด ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และสิ่งทอ เป็นต้น (Campos-Vega et al., 2015) ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาทิ เช่น สบู่ สครับ ก็มีการนำกากกาแฟไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ เพื่อช่วยสลายไขมัน ทำให้ผิวกระชับขึ้นจากสารคาเฟอีนที่มีในกากกาแฟ เป็นต้น

2) ด้านพลังงาน

น้ำมันที่สกัดได้จากกากกาแฟจะถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยการเปลี่ยนให้เป็นไบโอดีเซล และนำไปเป็นส่วนผสมในน้ำมันดีเซล B5 หรือ B20 ไบโอดีเซลคือน้ำมันที่ได้จากการนำน้ำมันจากพืชหรือสัตว์มาทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ โดยใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เรียกว่าปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification reaction) เช่น ใช้เมทานอล 40% v/v และ KOH 1.5%w/w เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิประมาณ 70°C พบว่าน้ำมันจากกากกาแฟสามารถเปลี่ยนไปเป็นไบโอดีเซลได้ 100% และน้ำมันมีคุณภาพผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน ASTM อีกทั้งเมื่อจัดเก็บน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน น้ำมันยังคงคุณภาพดั้งเดิม ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำมันจากกากกาแฟมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากจึงช่วยป้องกันและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Vardon et al., 2013) การผลิตไบโอดีเซลนั้นอาจมีวิธีการและขั้นตอนที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไขมันอิสระ (%FFA) ที่มีอยู่ในน้ำมันกาแฟ หากมี %FFA สูงจะใช้กระบวนการผลิตแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกจะใช้กรดเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) เพื่อลดปริมาณกรดไขมันอิสระให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันต่อไป และกากกาแฟที่เหลือจากการสกัดน้ำมันแล้วยังสามารถนำไปทำผลิตเป็นแท่งเชื้อเพลิงได้ ซึ่งให้ค่าพลังงานอยู่ในช่วง 20-37 MJ/kg ใกล้เคียงกับค่าพลังงานที่ได้จากปิโตรเลียม (41-48 MJ/kg) (Wen-Tien, 2012) ด้านการเกษตรและสิ่งแวดล้อม

กากกาแฟจัดเป็นวัสดุชีวมวล เมื่อนำไปให้ความร้อนในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน หรือเรียกว่ากระบวนการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) จะได้ผลผลิตเป็นไบโอชาร์ (biochar) ซึ่งหมายถึง วัสดุที่อุดมไปด้วยคาร์บอน ในกระบวนการแยกสลายด้วยความร้อนนั้นนั้นมีสองแบบหลักๆ คือ การแยกสลายแบบช้า โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 400-600°C โดยเพิ่มความร้อนขึ้น 0.1-1°C/วินาที และการแยกสลายแบบเร็ว ความร้อนจะเพิ่มขึ้นในอัตรา 10-200°C/นาาที ซึ่งการแยกสลายด้วยความร้อนแบบช้าจะให้ร้อยละผลผลิตของไบโอชาร์มากกว่าการแยกสลายแบบเร็ว นอกจากไบโอชาร์แล้วยังได้ผลผลิตร่วมอีกหนึ่งชนิดคือน้ำมัน (biooil) เช่น เมื่อนำกากกาแฟจำนวน 100 g ไปแยกสลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 450°C โดยเพิ่มอุณหภูมิ 50°C/นาาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของไบโอชาร์เท่ากับ 28 %w/w และได้น้ำมันร้อยละ 27.2 %w/w เป็นต้น (Vardon et al., 2013) ไบโอชาร์จะถูกนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นวัสดุปรับปรุงดิน ซึ่งพบว่าเมื่อทดลองปลูกหญ้า (Sorghum-Sudan grass) ในดินที่มีการผสมไบโอชาร์ในอัตราส่วนร้อยละ 2 ร่วมกับการให้ปุ๋ยน้ำแอมโมเนียมไนเตรตเช่นเดียวกันกับชุดควบคุม พบว่าหญ้ามมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าด้วยคุณสมบัติความเป็นรูพรุนของไบโอชาร์ สามารถช่วยเก็บกักความชื้นและแร่ธาตุต่างๆ ไว้เพื่อให้พืชได้ใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ นอกจากนี้ในไบโอชาร์นั้นยังมีธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชอยู่อีกด้วยอาทิเช่น N, S, P, K, Ca, Mg เป็นต้น เมื่อนำไบโอชาร์ที่ได้มาใช้ใน

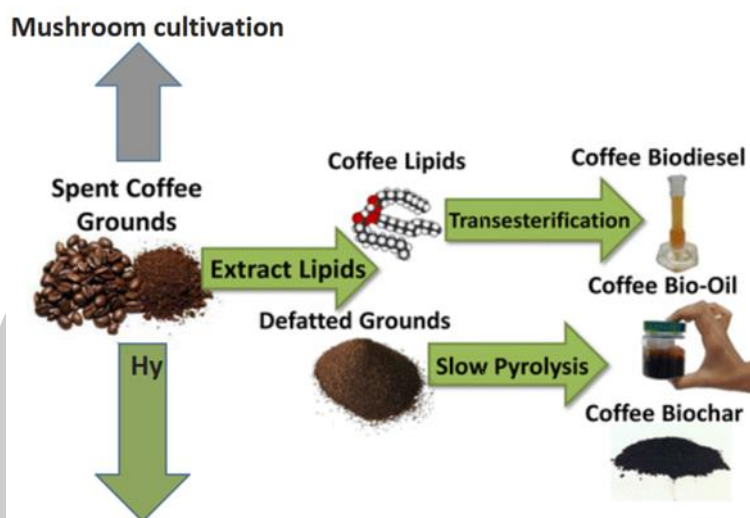
สารละลายต่าง KOH ในอัตราส่วน 5:1 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำกลับไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 700°C อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 7°C/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1 M HCl จนกระทั่งเป็นกลาง (pH 6.5-7) และนำไปอบแห้งเพื่อให้แห้งจะได้เป็นถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ซึ่งเมื่อนำไปผสมกับแคลเซียมแอลจิเนต (calcium alginate) จะได้เป็นเม็ดถ่านกัมมันต์ (spent coffee grounds into calcium-alginate beads, SCG-GAC) ดังแสดงในรูปที่ 8 สามารถใช้เป็นวัสดุดูดซับได้ ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับโดยการกำจัด acid orange 7 และ methylene blue พบว่าประสิทธิภาพการดูดซับอยู่ที่ 665.9 และ 986.8 mg/g ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นต้น (Kyung-Won et al., 2016)



ภาพที่ 8 ลักษณะของถ่านกัมมันต์จากกากกาแฟและประสิทธิภาพการดูดซับ acid orange 7 และ methylene blue

ที่มา: (Jung et al., 2016)

นอกจากนี้กากกาแฟยังสามารถนำมาใช้โดยไม่ต้องปรับสภาพหรือเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีก่อน เพียงแค่นำมาอบให้แห้งเพื่อใช้เป็นวัสดุทดแทนขี้เลื่อย ในการเป็นวัสดุเพาะเห็ดนางรมฮังการี พบว่าที่อัตราส่วนผสมกากกาแฟ 50% w/w มีการเดินของเส้นใยเชื้อเห็ดใกล้เคียงกับการใช้ขี้เลื่อย ร้อยเปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเห็ด (biological efficiency, %B.E) แล้ววัสดุเพาะที่มีส่วนผสมของกากกาแฟให้ประสิทธิภาพการผลิตดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากในกากกาแฟนั้นมีสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีน คาเฟอีน มากกว่าในขี้เลื่อย ซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายจะได้ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารให้เชื้อเห็ดนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ (วันทนา นาคีสรินทร์ และนภวรรณ รัตสุข, 2556) ดังนั้นจากที่ได้กล่าวถึงการใช้อย่างไรก็ตาม สามารถสรุปเป็นแผนภาพการใช้ประโยชน์ได้ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงการใช้ประโยชน์จากกากกาแฟ
ที่มา: (อ้างอิงจาก Vardon et al., 2013)

2.2 ถังเช่าสีทอง

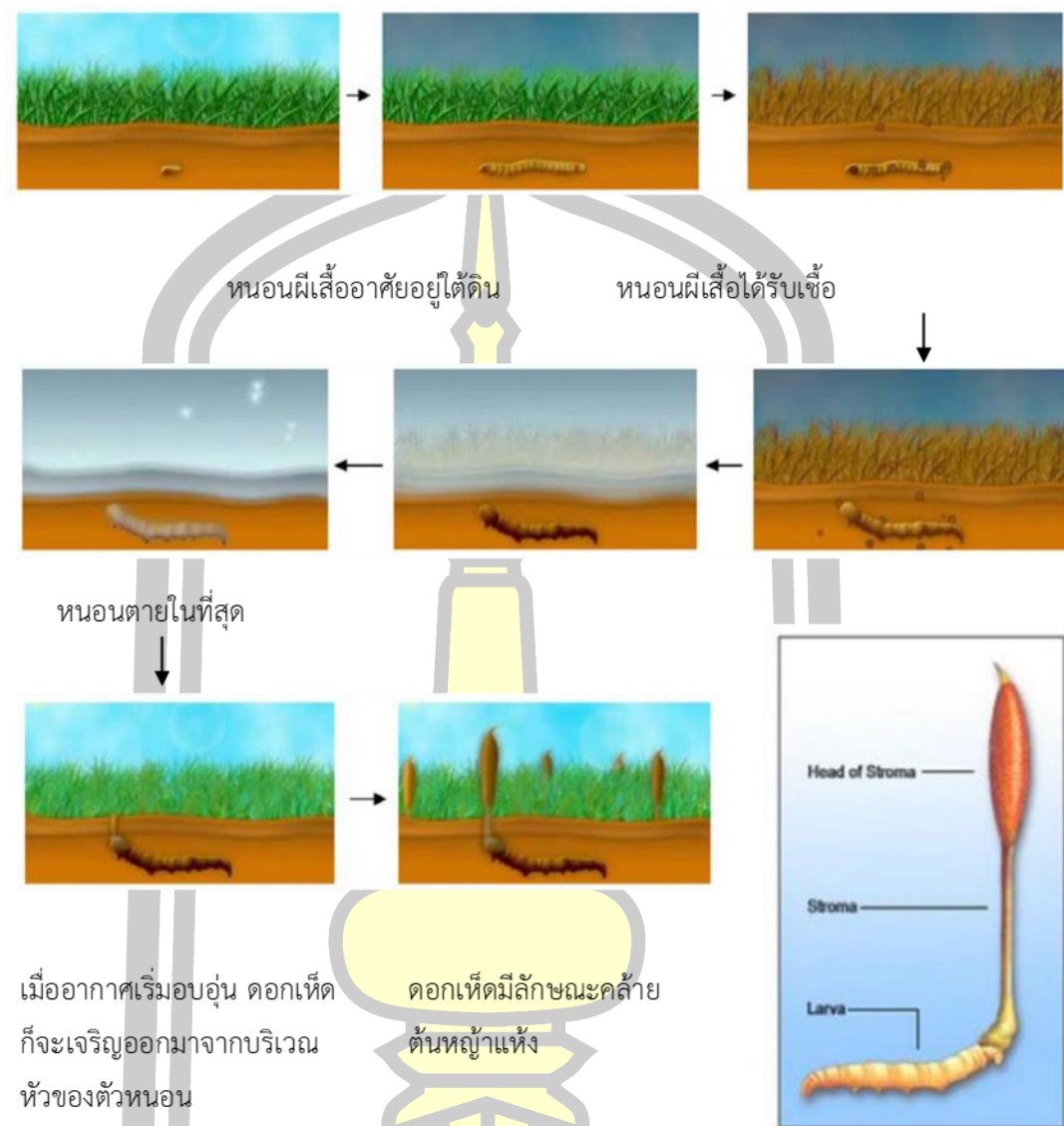
ถังเช่าสีทอง (*Cordyceps*) เป็นฟังไจชั้นสูงจัดอยู่ในกลุ่มของแอสคอฟังไจ (*sac fungi*) ในระยะที่มีการสืบพันธุ์จะสร้าง ascocarp แบบ peritheceium เป็นกลุ่มรวมกันอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า stroma ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งจันสนี้ตั้งขึ้นตามลักษณะของ stroma ที่มีส่วนปลายยอดพองออกเป็นกระเปาะ ดำรงชีวิตแบบพาราสิต มีสมาชิกประมาณ 300 สปีชีส์ อาศัยอยู่ทั่วโลก พบมากบริเวณป่าเขตร้อนที่มีความชื้นหรือในช่วงฤดูฝน ส่วนใหญ่เป็นพาราสิตบนตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลง เช่น ผีเสื้อ มด มวน ตัวต่อ และผึ้ง เป็นต้น มีไม่กี่สปีชีส์ที่พบบนแมงมุมและบน ascocarp ที่อยู่ใต้ดินของเห็ด

โดยทั่วไปเห็ดถังเช่ามักจะเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นฟังไจในกลุ่มที่เรียกว่า insect fungi เนื่องจากสมาชิกส่วนใหญ่ที่พบในจันสนี้จะเป็นสปีชีส์ที่เจริญบนแมลง เช่น ผีเสื้อ มด มวน ตัวต่อ ผึ้ง และแมลงวัน เป็นต้น Ascocarp จะเข้ามาทำลายแมลงที่เป็น host โดย ascocarp ที่ไปตกหรือสัมผัสบนตัวแมลงจะสร้าง germ tube แทะผ่านผิวหนังชั้นนอกของแมลงโดยการย่อยสลายไคติน เส้นใยจะเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายใน hemocoel ของแมลงหลังจากแมลงตายเส้นใยจะรวมตัวกันกลายเป็น sclerotium อัดแน่นจนเต็มอยู่ภายในร่างกายของแมลง ซึ่งแมลงในตอนนี้จะมีลักษณะคล้ายมัมมีเหลือเพียงเปลือกหุ้มชั้นนอกเท่านั้น เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม sclerotium จะพัฒนาไปเป็น stroma เจริญออกมาบนผิวหนังของแมลงที่เป็น host เมื่อ stroma เจริญเติบโตเต็มที่และ ascocarp ก็จะถูกปล่อยออกไปแล้วจากนั้นก็สลายไป ซึ่งซากของแมลงที่เหลืออยู่ก็จะมีการสร้าง stroma ขึ้นมาใหม่ได้อีก

แหล่งที่พบเห็ดถั่งเช่ามักจะแตกต่างกันไปตามแหล่งอาศัยของเจ้าบ้าน (host) ซึ่งอาจจะฝังอยู่ในดิน ซากพืชที่ทับถม หรือไม้ผุ สปีชีส์ที่พบตามพื้นดิน เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนหนอนผิเสื่อ จะสร้าง stroma ที่มีก้านชูขึ้นมาเหนือพื้นดิน ส่วนใหญ่พบในฤดูฝน เนื่องจากพึงใจต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโตเพื่อเจริญผ่านชั้นดินขึ้นมา สปีชีส์ที่เจริญบนแมลงที่อาศัยอยู่ตามผิวหน้าดินขึ้นไป เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนมวน มด ต่อ และผึ้ง ก็จะมาพบตามผิวหน้าดินเช่นเดียวกัน โดยที่ stroma ไม่ได้เจริญผ่านชั้นดินขึ้นมา แต่จะเจริญผ่านชั้นของใบไม้ที่คลุมแมลงอยู่ ส่วนสปีชีส์ที่พบตามส่วนต่างๆ ของพืชที่แมลงอาศัยอยู่มักจะพบได้ตลอดทั้งปี โดยส่วนใหญ่พบได้ตามต้นไม้ เนื่องจากแมลงจะอาศัยอยู่เพื่อการพลางตัวเองจากศัตรูตามธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นการกำบังตัวเองจากสภาพแวดล้อมที่ถั่งเช่าที่อยู่บนตัวอ่อนของจักจั่นก็เป็นอีกสปีชีส์ที่ใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาการหดเกร็งของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง หรืออาการชักในเด็กนิยมใช้กันมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บางสปีชีส์ที่เจริญบนเห็ด truffle จีโนม Elaphomyces เช่น *C. ophioglossoides* ก็มีรายงานถึงคุณสมบัติทางยาสมุนไพรเช่นกัน โดยใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ช่วยในการหมุนเวียนโลหิต และควบคุมการมีรอบเดือนให้เป็นปกติ นอกจากนี้เป็นยาสมุนไพรแล้วเห็ดถั่งเช่าบางสปีชีส์ยังมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูพืชบางชนิด เช่น ในประเทศแทนซาเนียพบว่าตัวอ่อนของด้วงชนิดหนึ่งที่เข้าทำลายระบบรากของต้นอ้อย และก่อปัญหาของการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นอย่างมาก *C. barnesii* เจริญอยู่ จึงมีความสนใจที่จะนำ *C. barnesii* ไปใช้ในการควบคุมตัวอ่อนของด้วงชนิดนี้ในไร่อ้อย และเนื่องจากเห็ดถั่งเช่ามีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงจึงน่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมี

2.2.1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

การที่ราแมลงได้ปนเปื้อนเข้าไปในวงจรชีวิตของแมลงอาจเกิดจากสปอร์ราตกลงบนตัวของแมลง หรืออาจจากการที่แมลงกินอาหารที่ปนเปื้อนราเข้าไป เส้นใยของราจะฝังตัวเข้าสู่อวัยวะภายใน และเจริญเติบโตอยู่ในเจ้าบ้าน (ตัวแมลง) ด้วยการกินอาหารจากตัวแมลงนั้น (รูปที่ 8) หลังจากนั้นราที่เป็นปรสิตนี้จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จนสามารถเข้าไปแทนที่อยู่ในลำตัวของแมลงนั้นทั้งตัว และกลายเป็นกลุ่มเส้นใยของรา หรือว่าไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยของราแมลงเมื่อเจริญเติบโตรวมตัวกัน เกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่กลายเป็นดอกเห็ด มีรูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นก้านสปอร์ราที่เหมือนกิ่งไม้ หรือเหมือนกับตาข่ายคลุมตัวแมลง ก้านสปอร์ก็พร้อมที่จะกระจายสปอร์ไปตกบนแมลงเป้าหมายตัวต่อไป



ภาพที่ 10 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่าทิเบต

ที่มา: ดัดแปลงจาก Asia Herbal Biotech (2009)

เห็ดถั่งเช่ามีหลายชนิดด้วยกัน ตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 9 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ที่มีชื่อเสียงมากที่สุด คือ เห็ดถั่งเช่าทิเบต หรือเห็ดถั่งเช่าแท้ (*Ophiocordyceps sinensis* หรือชื่อเดิม *C. sinensis*) ในภาษาจีนจะ เรียกว่า “ตั่งถั่งเช่า หรือ ตั่งถั่งเฉ้า” แต่ถ้าเรียกว่า “ถั่งเช่า หรือถั่งเฉ้า” จะหมายถึงเห็ดถั่งเช่าสีทอง เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือเห็ดถั่งเช่าเกาหลี (*C. militaris*, *Isaria tenuipes* หรือ *Isaria japonica* ตามลำดับ) หรือตัวอื่นๆได้ (Zhou et al., 2009)



ถั่งเช่าทิเบต (ถั่งเช่าแท้)

ถั่งเช่าสีทอง

ถั่งเช่าหิมะ (เกาหลี่)

ถั่งเช่าจ๊กจั่น (ว่านจ๊กจั่น)

ภาพที่ 11 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ

ที่มา: ัญญา ทะพิงค์แก และคณะ (2557)

2.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดถั่งเช่า

Stromata เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย เจริญออกมาจากแมลงแมงมุม หรือเห็ด truffle ที่ฝังอยู่ใต้ดิน อาจเกิดอยู่เดี่ยวๆ หรือมีหลาย Stromata ลักษณะอ่อนนุ่ม บางครั้งอาจพบที่มีลักษณะแข็งบ้าง แต่ก็มี ความแข็งไม่มากนัก มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ ทรงกระบอก ทรงกระบอกปลายป่อง คล้ายกระบอง หรือคล้ายกระบองปลายบาน เป็นต้น (รูปที่ 10) ก้านมักจะ เป็นกระบอกทรงตรง หรือโค้งงอ บางครั้งมีการแตกแขนง ส่วนที่ใช้ในการสืบพันธุ์อยู่ด้านบน ลักษณะ พองออกขนาดใหญ่กว่าส่วนก้าน เป็นที่เกิดของ perithecia รูปร่างแบบทรงกระบอกสั้น คล้าย กระบอง รูปไข่ เกือบกลม หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวมักจะหยาบ หรือเป็นปุ่มเล็กๆ เกิดจากส่วนของ perithecia ที่ยื่นออกมาหรือบางครั้งอาจมองเห็นเป็นหลุมเล็กๆ มีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง ไปจนถึงสีน้ำตาลหรือดำ บางสปีชีส์ส่วนของก้าน อาจจะมีสีแตกต่างกัน ขนาดของ Stromata แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสปีชีส์ และขนาดของ host ที่เป็นแหล่งอาศัย

พหุ ประ โท ชีวะ



ภาพที่ 12 รูปร่าง stromata แบบ capitate

ที่มา: <http://cordyceps.cgrb.oregonstate.edu/pages/systematics>

2.2.3 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นราแมลง (entomofungus) ในกลุ่มแอสโคไมซีต (Ascomycetes) ในจีนัส *Cordyceps* โดยพบในแมลงเจ้าบ้านหลายชนิด เช่น มด ผี ต่อ แตน แมงมุม เพลี้ย ตัวแมลงปอ ผีเสื้อ และหนอน เป็นต้น ถั่งเช่าสีทองมี stroma รูปร่างคล้ายกระบอง สีแดงส้ม (รูปที่ 11) เจริญบนตัวอ่อนหรือดักแด้ของผีเสื้อ พบได้ทั่วไป สปีชีส์นี้ถูกเรียกว่า *militaris* เนื่องจากมี stroma ลักษณะตั้งตรงมองดูคล้ายกับทำยี่ห้อของทหาร (Alexoplulos et al., 1996) เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นเชื้อราแมลงที่สามารถรับประทานได้และไม่เป็นอันตรายกับมนุษย์ (Sung et al., 2007)

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานดังนี้

อาณาจักร

Fungi

ไฟลัม

Ascomycota

คลาส

Pyrenomycetes

ออร์เดอร์

Hypocreales

แฟมิลี

Clavicipitaceae

จีนัส

Cordyceps

สปีชีส์

militaris

พหุ ประถมศึกษา



ภาพที่ 13 ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ และการผลิตสารต่างๆ จากเห็ดถั่งเช่า

โดยทั่วไปฟังไจที่เป็นพาราสิตจะเจริญและสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อย่างอิสระบน host ที่เป็นแหล่งอาศัย แต่มีหลายชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวมทั้งเห็ดถั่งเช่าดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Wang (1989) ที่ได้ทดลองการเพาะเห็ดถั่งเช่า 7 สปีชีส์ ได้แก่ *C. aphodii*, *C. gracillis*, *C. memorabilis*, *C. militaris*, *C. sobolifera*, *C. sphingum* และ *Cordyceps sp.* พบว่า เห็ดถั่งเช่าทุกสปีชีส์เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ขณะที่รายงานของ Hywel-Jones (1994) นำเห็ดถั่งเช่าซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในตัวอ่อนของผีเสื้อมาเพาะบนอาหารที่อุณหภูมิ 22°C ในที่มีดพบว่าเส้นใยบริสุทธิ์สามารถเจริญได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีการสร้าง ascospore จากการศึกษาของ Hodge และคณะ (1996) รายงานไว้ว่า *C. subsessilis* ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่บนซากแมลงซึ่งต้องการสารอาหารบางอย่างจากแมลงในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองดังกล่าว Sung และคณะ (2007) จึงได้มีการเลี้ยงเห็นประโยชน์จากเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่า จึงได้นำ stroma ของเห็ดถั่งเช่า 2 สปีชีส์ คือ *C. militaris* และ *C. nutans* แยกเชื้อบริสุทธิ์พบว่าเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่าทั้งสองสปีชีส์เจริญได้ดีบนอาหาร water agar และยังได้ทดลองนำเชื้อบริสุทธิ์ข้างต้นมาเพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารที่ประกอบไปด้วยแป้งข้าวเจ้า 5 กรัม แป้งข้าวสาลี 5 กรัม ผสมกับน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าเส้นใยจะเจริญได้ดี ดังนั้น Sung และคณะ (2007) จึงได้เกิดแนวคิดที่จะทดลองเลี้ยง *C. militaris* ในอาหารที่มีข้าวและดักแด้ของแมลงเป็นส่วนประกอบ พบว่าหลังจากการเพาะเชื้อเป็นเวลา 60 วัน จะมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่มี perithecia เกิดอยู่บน stroma ซึ่งสร้างอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถสังเกตเห็น asci จำนวนมากถูกปล่อยออกมาจาก perithecia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นอกจากจะเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่ายังมีประโยชน์ในการสร้างสารเมตาโบไลต์หลายชนิด เช่น cordycepin สร้างโดย *C. militaris* เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพในการต่อต้านการเกิดเนื้องอกได้อีกด้วย (Chang & Hayes, 1978) สาร polysaccharide (CS-F30) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย *C. sinensis* ในอาหารเหลว มีคุณสมบัติช่วยลดระดับ cholesterol ในเลือดได้ (Kihō et al., 1996) สาร erythrostominone, deoxyerythrostominone, 4-O-methyl erythrostominone, epierythrostominol, dcoxyerythrostominol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม naphthoquinones ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth สารประกอบทั้งหมด 6 ชนิดนี้มีผลในการต่อต้านเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมาลาเลีย นอกจากนี้ Cordyceps บางสปีชีส์ยังมีความสามารถในการสร้างสารประกอบชนิดใหม่ขึ้นอีกด้วย เช่น *C. pseudomilitaris* สร้างสาร cordyanhydrides A และ B สารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ Das และคณะ (2010) รายงานไว้ว่าสารเมตาโบไลต์ที่ *C. militaris* สร้างขึ้นยังมีฤทธิ์ต่างๆ อีกมากมาย เช่น เสริมสมรรถนะทางเพศ ต้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ/ชะลอความชรา ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว และปรับระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (ตารางที่ 3)

ในอุตสาหกรรมยาที่มีความสนใจเกี่ยวกับการคัดเลือกหาสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากราเพื่อค้นหาชนิดใหม่ ราในกลุ่ม *C. sinensis* เป็นราที่ใช้เป็นยาจีนมาช้านาน ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของสารที่แยกจาก fruiting body ของราชนิดนี้ พบว่าสารที่ได้มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ K562, Wish, Calu-1 และ Raji tumer cell line คุณสมบัติของสารแสดงให้เห็นว่าแตกต่างจาก cordycepin โดยพบว่าสารตัวนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกได้มากกว่า cordycepin ที่ได้จากเชื้อรา *C. militaris* และ polysaccharides แยกได้จากกระบวนการสกัดจาก *C. sinensis* ซึ่ง polysaccharides มีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการคือ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ในหนู กระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ยับยั้งการเจริญของเซลล์ human leukemic U 937 (Chen et al., 1997)

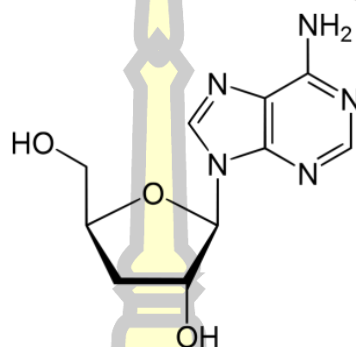
พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	
Pro-sexual	เสริมสมรรถนะทางเพศ
Anti-inflammatory	ต้านการอักเสบ
Anti-oxidant/anti-aging	ยับยั้งอนุมูลอิสระ/ชะลอความชรา
Anti-tumour/anti-acner/ anti-leukemic	ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว
Anti-proliferative	ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์
Anti-metastatic	ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง
Immunomodulatory	ระบบภูมิคุ้มกัน
Anti-microbial	มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ อันได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ริกเกตเซีย เชื้อรา เชื้อปรสิต และโปรโตซัว
Insecticidal	มีฤทธิ์ฆ่าแมลง
Larvicidal	มีฤทธิ์ฆ่าหนอน
Anti-fibrotic	ต้านการเกิดเส้นใยพังผืด (Anti-fibrotic)
Steroidogenic	เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมน สเตียรอยด์
Hypoglacaemic	ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ
Hypolipidaemic	ลดไขมันในเส้นเลือด
Anti-angiogenic	ขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย
Anti-diabetic	ป้องกัน หรือบรรเทาอาการโรคเบาหวาน
Anti-HIV	ต้านเชื้อเอดส์
Anti-malarial	ต้านโรคมาลาเรีย หรือโรคไข้จับสั่น
Anti-fatigue	ลดอาการเหนื่อยล้า
Neuroprotective	ป้องกันเซลล์ประสาท
Liver-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ
Reno-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของไต
Pneumo-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของปอด

ที่มา: Das et al. (2010)

C. militaris สามารถผลิตสาร Cordycepin: 3'-Deoxyadenosine (ภาพที่ 14) หรือเรียกว่า 9-cordyceposidoadenine มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{13}N_5O_3$ ขนาด mol wt. 251.24 ประกอบด้วย C 47.80% H 5.22% N 27.88% และ O 19.11% มีโครงสร้างเป็นผลึกรูปเข็ม จุดหลอมเหลว 225-226°C มีสูตรโครงสร้างดังนี้ (Bentley, W., 1951)



ภาพที่ 14 โครงสร้าง Cordycepin (3'-Deoxyadenosine)

ที่มา: Bentley, W., 1951

Cordycepin เป็น nucleoside ชนิด 3'-Deoxyribose ที่พบในธรรมชาติจาก *C. militaris* ประกอบด้วยน้ำตาล pentose ต่อกันเป็นกิ่งก้านสาขา (ตารางที่ 4) มีการศึกษาการสังเคราะห์ cordycepin โดยวิธี Biosynthesis พบว่ามีการเติม Adenosine- $U-C^{14}$ ลงไปในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในเชื้อ *C. militaris* มีการสังเคราะห์ cordycepin อย่างรวดเร็ว ปริมาณ cordycepin ที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการเปลี่ยนจาก Adenosine

Cordycepin มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ KB cell culture, *B. subtilis* เซลล์มะเร็งในสัตว์ปีก และเซลล์มะเร็ง "Ehrlich ascites carcinoma" ในตัวไร แต่ไม่เคยมีรายงานว่ามีผลต่อระบบเนื้อเยื่อของสัตว์อื่นๆ มีรายงานการสังเคราะห์ cordycepin โดยวิธี Chemical synthesis ในปี ค.ศ. 1960 โดย Todd และในปี ค.ศ. 1961 โดย Lee และคณะ โดยพบว่าเมื่อใช้ derivative ของ 3'-Deoxyribose เป็นสารตั้งต้น และ 2, 5-di-O-benzoyl-3-deoxy-D-ribofuranosyl bromide เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ 3'-Deoxyadenosine จะได้ 3'-Deoxyadenosine-8- C^{14} และ 3'-deoxynucleoside ชนิดอื่นๆ นอกจาก cordycepin แล้วจากการทดลองใน *C. militaris* พบว่าประกอบด้วย beta-sitosterol, ergosterol, D-manmital, adenine, adenosine การสกัดส่วนไมซีเลียของ *C. militaris* ด้วยน้ำร้อน พบว่าประกอบด้วย 5'-adenosine monophosphate และกรดนิวคลีอิกอื่นๆ อีกหลายตัว ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการถูกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดของคน (Ikumoto et al., 1991)

2.4 การศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจากงานวิจัยต่างๆ

จากการสืบค้นงานวิจัยเกี่ยวกับสภาวะในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจากงานวิจัยอื่นๆ พบว่าจะมีองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ ธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโอ๊ต และถั่วต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนีย เปปโตน ผงนม ถั่วเหลืองบด ผงหนอนไหม สารสกัดยีสต์ และไข แหล่งวิตามิน เช่น วิตามินบี 1 แหล่งธาตุ เช่น โปแตสเซียม แมกนีเซียม อลูมิเนียม และเหล็ก



ตารางที่ 3 สูตรอาหาร สภาวะในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดถังเช่าสีทอง (fruiting body) และปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่พบจากงานวิจัยต่างๆ

สูตรอาหาร	สารสำคัญ	สภาวะการเพาะเลี้ยง	อ้างอิง
ข้าว โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ น้ำกลั่น (1 : 1)	Cordycepin (2.7%) Cordycepic acid (4%) Polysaccharide (4.2%)	เพาะเลี้ยงที่มืด 2 สัปดาห์ อุณหภูมิ 25°C ความชื้น 70% แล้วเปลี่ยนมาให้ แสงที่ 600±20 lux นาน 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง นาน 40 วัน	Chen, Liu and Chang, 2011
ข้าว 30 g, ผงหนอนไหม 1 g สารอาหาร อื่นๆ 45 มิลลิลิตร (2% dextrose, 1% peptone, 0.1% KH ₂ PO ₄ , 0.1% MgSO ₄ , 0.01% Vitamin B1)	Cordycepin (1.72 mg/g) Adenosine (0.96 mg/g) Mannitol (120.81 mg/g)	เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20°C นาน 20 วันในที่มืด หลังจากนั้นให้แสงจนกว่า จะเกิดดอกเห็ดสีส้ม	Liu, Huang and Zhou, 2014
ข้าว (20 g), glucose (7.2 g), castor sugar (3.6 g), peptone (4.3 g), milk powder (4.3 g), soybean meal (8.6 g), KH ₂ PO ₄ (1.4 g), MgSO ₄ (0.7 g), ammonium citrate (0.7 g), vitamin B1 (0.05 g) และน้ำ 30 มิลลิลิตร	Cordycepin (13 mg/g) Carotenoids (500 µg/g)	แสง LED 10-19 µmol/m ² /s ให้แสง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 22°C ความชื้น 88% เพาะเลี้ยง นาน 30 วัน	Yi et al., 2014
ข้าวโพดบด (Corn mill) 75 กรัมต่อ กิโลกรัม สารละลายน้ำตาลมันฝรั่ง (200 กรัม) + น้ำต้มข้าวโพดที่ก่อก่อน (100 กรัม) 1000 มิลลิลิตร Glucose 5 กรัมต่อลิตร Sucrose 15 กรัมต่อลิตร Peptone 5 กรัมต่อลิตร Yeast extract 5 กรัมต่อลิตร KH ₂ PO ₄ 0.5 กรัมต่อลิตร K ₂ HPO ₄ 0.5 กรัมต่อลิตร MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 กรัมต่อลิตร	Cordycepin (8.18 mg/g)	บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 22-25°C นาน 2 สัปดาห์ แล้วให้แสง 14 ชั่วโมงต่อ วัน อุณหภูมิ 17-21°C จากนั้น ให้แสง 12 ชั่วโมง ต่อวัน อุณหภูมิ 17-21°C	ธัญญา ทะพิงค์แก และคณะ, 2557

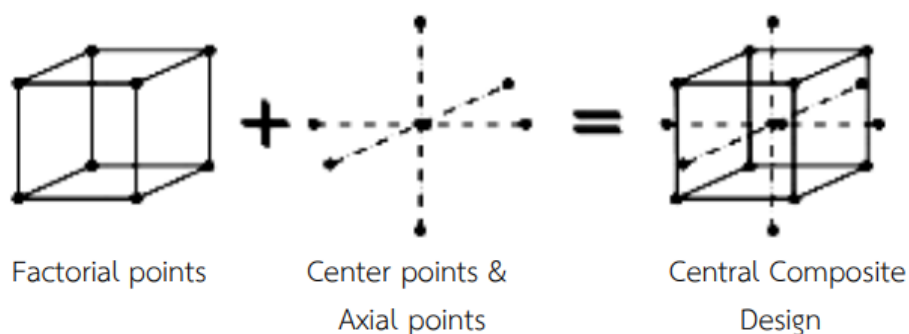
2.5 แผนการทดลอง Central composite design (CCD)

การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design; CCD) เป็นการออกแบบการทดลองโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ ที่เมื่อตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งเพิ่มหรือลดค่าตัวแปรอื่นอาจเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง ทำให้ต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) การกำหนดสถานะการทดลองที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปร ว่าควรมีจำนวนการทดลองกี่การทดลองจึงเหมาะสมและครอบคลุม เช่น ถ้าต้องการศึกษาตัวแปร 3 ตัว จำนวนการทดลองคือ $3^3 = 27$ การทดลอง ดังนั้นหากมีการศึกษาตัวแปร 5 ตัวแปร จำนวนการทดลองคือ $3^5 = 234$ การทดลอง ซึ่งไม่เหมาะสมกับสถานการณ์ปัจจุบันที่มีทรัพยากรจำกัด ทางออกของการแก้ปัญหาคือ การใช้การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง ซึ่งเป็นการออกแบบแผนการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรเชิงเส้นโค้ง แต่ใช้จำนวนการทดลองไม่มาก เช่น กรณี 3 ตัวแปรจะใช้เพียง 16 แผนการทดลองเป็นต้น การออกแบบการทดลองแบบประสมกลางเป็นการทดลองที่ 3 ระดับ นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ 10, 0, +1 คือจะมีการปรับตัวแปรที่ศึกษาตัวแปรละ 3 ค่า โดยทำการเลือกสถานะการทดลองบางการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ รูปแบบที่ได้จะยังคงมีผลของตัวแปรหลัก (main effect) ความสัมพันธ์ของตัวแปร (interaction) และสมการกำลังสอง (quadratic terms) โดยใช้ทรัพยากรไม่มาก (จรัล, 2552)

ตัวอย่างของการออกแบบการทดลองแบบประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปรประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

1. Factorial points เป็นการนำ 2 level full factorial มาเป็นส่วนหนึ่งในการทดลอง
2. Axial points เป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่ง โดยให้ตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลางคือ 0
3. Center points เป็นการปรับค่าตัวแปรทุกตัวแปรเป็นค่ากลาง

ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางสำหรับ 3 ตัวแปร

ที่มา: จรัล, 2552

CCD เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับปัจจัยแต่เป็นการลดสิ่งทดลองขณะที่ CCD 3 ปัจจัยจะมีการทดลองทั้งหมด $2^3 + (2 \times 3 + 1)$ โดยที่เทอม $2(2n + 1)$ เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมาและเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลางเป็น 3 จะได้เท่ากับ 17 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์, 2544) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าของ crowde level ใน Central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

Treatment	Code lever		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1.68	0	0
10	0	-1.68	0
11	0	0	0
12	+1.68	0	-1.68
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	+1.68
16	0	0	0
17	0	0	0

ที่มา : อนุวัตร (2549)

บทที่ 3

วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ท้องด้วยกากกาแฟ

นำกากกาแฟที่ได้มาอบให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาซึ่งที่ ปริมาณต่างๆ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ท้อง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่ม ตลอด (Completely Randomize Design; CRD) มี 1 ปัจจัยคือสัดส่วนกากกาแฟที่ใช้เป็นแหล่ง คาร์บอนทดแทนข้าวในอาหารสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ได้แก่ 0 (control), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 6

3.1.1 การเตรียมเชื้อเห็ด

นำดอกเห็ด (fruiting body) ของเห็ดถึงเข้าสู่ท้องมาเลี้ยงในอาหารแข็งนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ว (PDA) เป็นเวลา 7 วัน บ่มในที่มืด ในตู้บ่มที่ 20°C ก่อนตัดเส้นใยลงเลี้ยงในอาหารเหลว นึ่งฆ่าเชื้อ แล้ว (PDB) เป็นเวลา 14-21 วัน บ่มในที่มืด ในตู้บ่มที่ 20°C เขย่าขวดวันละสองครั้งเข้าเย็น เชื้อ อาหารเหลวจะนำไปใช้ในการทดลอง

3.1.2 ขั้นตอนการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงให้เกิดดอก

- 1) ล้างมันฝรั่งและข้าวโพดฟักก่อนให้สะอาด ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นตามขวาง ประมาณ 200 กรัม ต้มในน้ำกลั่น 1200 มิลลิลิตร เดือดนาน 15 นาที แล้วกรองเอาน้ำ
- 2) ชั่งสารทั้งหมด (ตารางที่ 6) แล้วนำมาละลายในน้ำมันฝรั่งสกัด ปรับปริมาตร 1000 ml และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.0
- 3) ปั่นผักแต่ใหม่ และไข่ไก่ต้มโดยเครื่องปั่น ในปริมาณตามที่ระบุในตารางที่ 6 ผสม ลงในส่วนผสมเบื้องต้น
- 4) ชั่งข้าวเจ้าและหรือกากกาแฟ (ตารางที่ 6) ลงในขวดเพาะขนาด 16 ออนซ์ ที่ เจาะฝาและมีสำลีปิดที่รู ขวดละ 35 g จากนั้นเติมอาหารที่ได้จากการเตรียมในเบื้องต้น 50 มิลลิลิตร ต่อขวด
- 5) นำขวดอาหารไปนึ่งข้าวให้สุกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ก่อน นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำ ออกมาพักทิ้งไว้ 1 คืน

ตารางที่ 5 สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าเพื่อให้เกิด Fruiting body

ลำดับ	สิ่งที่ใช้	ปริมาณ
1	ข้าวเจ้า และหรือกากกาแฟ 0-100%	1 กิโลกรัม
2	มันฝรั่ง	200 กรัม
3	ข้าวโพดอ่อน	100 กรัม
4	ข้าวโพดบด	75 กรัม
5	กลูโคส	10 กรัม
6	น้ำตาลทราย	15 กรัม
7	เปปโตน	5 กรัม
8	ยีสต์สกัด	5 กรัม
9	ดักแด้ใหม่	100 กรัม
10	ไซไคติม	100 กรัม
11	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5 กรัม
12	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 กรัม
13	เหล็กซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.002 กรัม
14	น้ำสะอาด	1.2 ลิตร

(ดัดแปลงจากสูตรลู่หยุด แชมป์ประเสริฐ และสูตรของธัญญา ทะพิงค์แก และคณะ, 2557)

3.1.3 การลงเชื้อและการบ่มเชื้อ

1) นำสเปรย์แอลกอฮอล์มาฉีดฆ่าเชื้อภายในตู้เชื้อเชื้อ และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องแล้ว เช็ดให้แห้ง เปิดหลอดยูวีเพื่อฆ่าเชื้อนาน 30 นาที

2) เมื่ออาหารเย็นแล้วนำมาเติมเชื้อเห็ดซึ่งได้จากการเตรียมในเบื่องตันที่อยู่ในรูปอาหารเหลวมาใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าเพื่อให้เกิดดอกในขวดเลี้ยง (16 ออนซ์) ขวดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยไซริงค์ปลอดเชื้อลงในอาหารบริเวณตรงกลางของขวดอาหาร ในตู้ปลอดเชื้อ ก่อนลงเชื้อให้เขย่าขวดหัวเชื้อเห็ดก่อนนำมาใช้ ทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ

3) ทำการบ่ม ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่

- ระยะการเจริญของเส้นใย บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 22°C องศาเซลเซียส

ความชื้น 60-65% เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- ระยะกระตุ้นให้ออกดอก โดยเปิดไฟให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 18°C ความชื้น 60-65% เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- ระยะการเจริญเติบโตของดอก เมื่อถึงเช้าสีทองมีดอกยาวขนาด 1 เซนติเมตร ปรับให้แสงลดลงเหลือ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 18-22°C เพิ่มความชื้น 70-75% เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

- ระยะการเจริญเติบโตของดอก เมื่อถึงเช้าสีทองมีดอกยาวมากกว่า 2 เซนติเมตร ปรับให้แสงเพิ่มขึ้น 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 18-22°C เพิ่มความชื้น 80-85% เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์

4) ฟอสเฟอรัส 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ในห้องเพาะเลี้ยงทุกวัน วันละ 1 ครั้ง กรณีเส้นใยเกิดเป็นจำนวนมากแต่ไม่เกิดตุ่มดอก (บ้ำใย) ให้เตรียมสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาสเปรย์มาพ่นลงในขวดอาหาร (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ)

3.1.4 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

1) นำสเปรย์แอลกอฮอล์มาพ่นฆ่าเชื้อบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยวเห็ดถึงเช้าสีทอง และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องแล้วเช็ดให้แห้ง

2) ใช้มีดที่ทำความสะอาดแล้วตัดแบ่งเห็ดออกเป็น 4 ส่วน แล้วใช้ปากคีบที่เช็ดทำความสะอาดแล้วค่อยๆ ดึงก้านเห็ดถึงเช้าสีทองออกมาจากขวด วางเรียงในถาด

3) ทำการแยกวัสดุเพาะที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวโดยใช้มีด นำมาวางลงในถาดที่สะอาด

4) ทำการอบเห็ดและวัสดุเพาะเห็ดถึงเช้าสีทอง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยก้านเห็ดถึงเช้าสีทองใช้เวลาในการอบ 24 ชั่วโมง และวัสดุเพาะเห็ดถึงเช้าสีทองใช้ระยะเวลาในการอบนาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้มีความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์

5) หลังจากนำออกจากตู้อบแล้วให้เก็บผลผลิตไว้ในภาชนะที่สามารถป้องกันความชื้นและแสง หรือเก็บไว้ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพสุญญากาศ

6) เก็บผลผลิตไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์หรือเพื่อการวิเคราะห์อื่นๆ ต่อไป

3.1.5 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

เก็บตัวอย่างเห็ดเพื่อนำมาวิเคราะห์ 3 ช่วง ได้แก่

- 1) ช่วงเส้นใยเดินเต็มอาหารมีสีขาวแต่ยังไม่เปิดไฟให้แสง
- 2) ช่วงเส้นใยเดินเต็มอาหารเปิดไฟให้แสงและเส้นใยมีสีเหลืองทอง

3) ช่วงหลังจากตัดดอกแล้ว

นำตัวอย่างกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงที่ 3 ช่วง และดอกเห็ดถึงเข้าสู่ห้องในช่วงที่สามมาสกัดและวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- น้ำหนักเห็ดสดและแห้งเฉลี่ยต่อขวด (g)
- ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด (mm)
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/kg นน.แห้ง)
- ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg CE/kg นน.แห้ง)
- ปริมาณสารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ ได้แก่ cordycepin และ adenosine (mg/kg นน.แห้ง)
- ปริมาณสารกลุ่มกรดฟีนอลิก 10 ชนิด ได้แก่ gallic acid, dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, vanilic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapinic acid
- ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี DPPH และ FRAP
- ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.2 การสกัดตัวอย่าง

การสกัดตัวอย่างอาศัยวิธีวิทยาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface Methodology, RSM) ร่วมการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design, CCD) วิเคราะห์อิทธิพลร่วมของหลายตัวแปรอิสระ (ปัจจัย) ที่มีต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถึงเข้าสู่ห้อง (ค่าตอบสนอง) โดยปัจจัยหลักและช่วงในการศึกษานี้ประกอบด้วยความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัด (X_1 : 30-80 %v/v) อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อกากกาแฟ ($X_2 = 5-10 : 1$ ml/g) และระยะเวลาในการสกัด ($X_3 = 25-60$ นาที) ดังแสดงในตารางที่ 7

การออกแบบการทดลองตาม CCD ในงานวิจัยนี้ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง โดย 8 แฟคทอเรียล 6 แกน และ 6 จุดกึ่งกลาง ดังตารางที่ 8 คำนวณจาก $N = 2^n + 2n + n_c$ โดยที่ N คือจำนวนการทดลอง n คือจำนวนตัวแปรอิสระ n_c คือจำนวนการทดลองซ้ำตำแหน่งกลาง (Montgomery, 2013) ข้อมูลจากชุดการทดลอง

ข้อมูลจากชุดการทดลองวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของหลายปัจจัยต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ และฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถึงเข้าสู่ห้องด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อประเมินความสอดคล้องของแบบจำลอง (Fitted model) โดยค่าความสอดคล้องของแบบจำลองตัดสินจาก R^2 และทดสอบนัยสำคัญของเทอมของแบบจำลองที่อยู่บนพื้นฐานของค่า p -value และ

F-value พร้อมทั้งสร้างแบบจำลองทำนายผลการทดลองในรูปสมการพหุนามกำลังสอง (Quadratic Polynomial Equation) แสดงความสัมพันธ์ร่วมของแต่ละปัจจัย ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (Montgomery, 2013) ดังสมการที่ 1 และสถานะที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม Design Expert

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ ร้อยละผลได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทองที่ทำนายได้ β_0 คือค่าคงที่ $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{iii}$ คือ สัมประสิทธิ์การถดถอย และ x_i, x_{ii} คือ ปัจจัยในการทดลอง

ในการสกัดใช้ตัวอย่างแห้ง 10 กรัม เติมนเอทานอลที่ความเข้มข้น และปริมาณตามตารางที่ 8 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (Vortex mixture) เป็นระยะเวลา 30 วินาที จากนั้นแช่ในเครื่องอัลตราโซนิกชนิดอ่างน้ำ (Ultrasonic bath) ตามระยะเวลาตารางที่ 8 เมื่อครบเวลาตามกำหนดนำไปกรองแยกกากภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วย Buckner Funnel และกระดาษกรอง (Whatman No.1) เก็บส่วนที่ได้จากการกรองไว้ กากที่เหลือนำมาสกัดซ้ำอีกรอบ เทสารสกัดที่ได้รวมกันนำไประเหยเอทานอลออกที่อุณหภูมิ 40°C ด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และส่วนที่เหลือมาบันทึกปริมาตร เก็บสารสกัดในขวดสีชาและแช่ในตู้เย็น รอการวิเคราะห์

ตารางที่ 6 ปัจจัยและระดับปัจจัยในการทดลอง

Factor	Level				
	$-\infty$	-1	0	+1	$+\infty$
Ethanol concentration (X1)	15	30	45	60	75
Liquid-to-Solid ratio (X2)	20	40	60	80	100
Extraction time (X3)	7.5	15	22.5	30	37.5

ตารางที่ 7 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง

Run number	X1 (%v/v)	X2 (ml/g)	X3 (นาที)
1	30	40	15
2	60	40	15
3	30	80	15
4	60	80	15
5	30	40	30
6	60	40	30
7	30	80	30
8	60	80	30
9	15	60	22.5
10	75	60	22.5
11	45	20	22.5
12	45	100	22.5
13	45	60	7.5
14	45	60	37.5
15	45	60	22.5
16	45	60	22.5
17	45	60	22.5
18	45	60	22.5
19	45	60	22.5
20	45	60	22.5

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตรวจวัดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay (Singleton and Rossi, 1965) โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจึงแสดงในรูป mg ของ gallic acid/g น้ำหนักตัวอย่างแห้ง สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ความแตกต่างความเข้มข้นของ gallic acid เตรียมใน 80% methanol ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64 mg/ml ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

reagent ตัวอย่าง 12.5 μl (กรณีเป็นเซรัมตัวอย่างละ 0.10 g ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นจำนวน 9 ml ผสมด้วย Vortex Mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน) ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 μl และสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า) ปริมาตร 12.5 μl หลังจากนั้น 6 นาที เติม 7% sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 125 μl และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 μl จากนั้นปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometers (Synergy HT, Biotek instruments, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สารมาตรฐานที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานคือ gallic acid เตรียมที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64 mg/ml แสดงผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วย mg GAE/ kg น้ำหนักแห้ง

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างตามวิธีการของ Dewanto และคณะ (2002) นำตัวอย่างมา 25 μl (กรณีเป็นเซรัมตัวอย่างละ 0.10 g ใส่ลงในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่นจำนวน 9 ml ผสมด้วย Vortex Mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน) มาเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 7.5 μl และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 12.5 μl ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 5 นาที นำมาเติม AlCl_3 (10%) ปริมาตร 15 μl จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 M NaOH ปริมาตร 50 μl และน้ำกลั่น 27.5 μl จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที จากนั้น นำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ใช้ น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณโดยใช้ (+)-catechin เป็นสารมาตรฐาน (mg CE/kg dry weight) โดยใช้กราฟมาตรฐาน (+)-catechin เตรียมที่ความเข้มข้น 0–400 $\mu\text{g/ml}$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine

วิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang และคณะ (2009) กรองสารสกัดที่ได้ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงในขวดเก็บสาร แยกและวิเคราะห์สารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu ที่ต่อกับคอลัมน์รุ่น C-18 (ขนาด 4.6 \times 250 mm ที่มีอนุภาคขนาด 5 ไมครอน) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร สภาวะที่ใช้สำหรับการแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยน้ำและเมทานอลในอัตราส่วน 92 : 8 โดยปริมาตร กำหนดให้ระบบคงที่ (isocratic) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์

เท่ากับ 30°C ใช้สารมาตรฐาน cordycepin และ adenosine ของบริษัท Sigma Chemical Corporation โดยเตรียมในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0-100 mg/L

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิก

ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 38 °C ใช้คอลัมน์ชนิด C-18 column, 250 x 4.6 mm ที่อัตราการไหล 0.8 ml/min ตัวตรวจจับชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ 280 nm ปริมาตรฉีดตัวอย่าง 20 µL เฟสเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์กรดฟีนอลิก ประกอบด้วยสารละลาย A = 1% Phosphoric acid (pH 2.58) และสารละลาย B = Acetonitrile สารมาตรฐานกรดฟีนอลิก 10 ชนิด ได้แก่ gallic acid, dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, vanilic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapinic acid โดยใช้เกรเดียนสำหรับการวิเคราะห์กรดฟีนอลิก

3.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.7.1 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Nagai และคณะ (2005) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร (กรณีเป็นเซรัมตัวอย่างละ 0.10 g ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นจำนวน 9 ml ผสมด้วย Vortex Mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน) และสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 100 µl ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทานาน 1 นาที จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่ได้ใส่ส่วนสกัด ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH} = \frac{A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ทดสอบ}}}{A_{\text{ควบคุม}}} \times 100$$

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน

3.7.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างตรวจวัดได้โดยการใช้อนุมูลอิสระเสถียร 2,4,6-tri (2-pyridyl)-tri-azine (TPTZ) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างด้วยสาร

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain, 1996) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดยเตรียมสารอนุมูลอิสระเสถียร FRAP ให้มีความเข้มข้น $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ โดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย นำมาผสมกับตัวอย่างในปริมาตร $30 \mu\text{l}$ (กรณีเป็นเซรัมตัวอย่างละ 0.10 g ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นจำนวน 9 ml ผสมด้วย Vortex Mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน) ใส่ในหลุม microplate แล้วเติมสารละลาย FRAP reagent $270 \mu\text{l}$ แต่ blank ให้เติม Acetate buffer ลงไปแทนสารละลาย FRAP reagent ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการคำนวณทำเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แล้วรายงานค่าที่ได้ในรูป mg สมมูลของ FeSO_4 ($\text{mg Fe(II)}/\text{kg dry weight}$)

3.7.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทำโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chan และคณะ (2008) มีวิธีทำโดยสรุปดังนี้ ปิเปตตัวอย่างปริมาตร $40 \mu\text{l}$ (กรณีเป็นเซรัมตัวอย่างละ 0.10 g ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นจำนวน 9 ml ผสมด้วย Vortex Mixer จนเป็นเนื้อเดียวกัน) ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M , $\text{pH } 6.8$) ปริมาตร $80 \mu\text{l}$ เอนไซม์ไทโรซิเนส 30 Units ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเติมสารละลาย L-DOPA (2.5 mM) ปริมาตร $40 \mu\text{l}$ ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 475 nm โดยใช้เครื่อง microplatereader spectrophotometers (Synergy HT, Biotek instruments, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละตัวอย่างทำ แบบลงที่ซึ่งประกอบไปด้วยทุกอย่างยกเว้นไม่เติม L-DOPA ใช้วิตามินซีและกรดโคจิกเป็นควบคุมบวก (positive control) ผลการทดลองเปรียบเทียบกับควบคุม (A ควบคุม) ซึ่งจะเติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = (A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ทดสอบ}}) / A_{\text{ควบคุม}} \times 100$$

คัดเลือกตำรับเซรัมหน้าขาที่มีผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและอนุมูลอิสระสูงสุด มีความคงตัวและไม่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองต่ออาสาสมัครเพียง 1 ตำรับไปทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครในขั้นต่อไป

3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA, Analysis of Variance) แบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, Completely Randomized Design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Rang test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) วิธีวิทยาพื้นผิวตอบสนอง (Response surface Medthodology, RSM) ร่วมการออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design, CCD)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเจริญของถั่วงา

แสงเป็นปัจจัยหนึ่งในการเจริญของเส้นใยและการเกิดดอกของถั่วงา ในช่วง 2 สัปดาห์แรกหลังจากลงเชื้อในอาหารเพาะแล้วเส้นใยจะเจริญไปทั่วอาหารโดยไม่ต้องแสง เส้นใยถั่วงาที่ได้อาจมีลักษณะขาว (ภาพที่ 4.2 ซ้าย) เจริญเต็มวัสดุเพาะ หลังจากนั้นจึงเริ่มกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกโดยการให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน จะสังเกตว่าตุ่มดอกถั่วงาจะเริ่มปรากฏ (ภาพที่ 4.2 กลาง) เส้นใยจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจากการกระตุ้นของแสงให้ถั่วงาสร้างรงควัตถุโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสำคัญออกมา เมื่อเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 60 วัน ดอกเห็ดถั่วงาจะยาวขึ้น ดอกมีสีเหลืองทอง (ภาพที่ 4.2 ขวา) หลังจากนั้นก็สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้



ภาพที่ 16 แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยถั่วงาบนอาหารแข็งเมื่อบ่มในที่มืด (ซ้าย) การเกิดตุ่มดอกเมื่อเปิดให้แสง (กลาง) และการเจริญของดอกเห็ดถั่วงา (ขวา)

4.1.1 น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเห็ดถั่วงา

จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่วงาโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน พบว่าแหล่งโปรตีนจากธัญพืชให้ปริมาณผลผลิตใกล้เคียงกัน ได้ในช่วง 16.66-27.00 g น้ำหนักสด/ขวด และ 3.67-5.67 g น้ำหนักแห้ง/ขวด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 น้ำหนักดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง (g/ขวด ขนาด 16 ออนซ์) ที่ได้เพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน

ทริทเมนต์	องค์ประกอบในอาหารเลี้ยง	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
T1	ข้าวเจ้า 100% : กากกาแฟ 0%	23.33±3.51	4.86±0.91
T2	ข้าวเจ้า 90% : กากกาแฟ 10%	18.33±2.08	4.63±0.22
T3	ข้าวเจ้า 80% : กากกาแฟ 20%	23.33±1.52	5.67±0.26
T4	ข้าวเจ้า 70% : กากกาแฟ 30%	21.00±3.60	5.08±0.44
T5	ข้าวเจ้า 60% : กากกาแฟ 40%	21.33±3.20	4.85±0.46
T6	ข้าวเจ้า 50% : กากกาแฟ 50%	23.33±1.52	5.21±0.57
T7	ข้าวเจ้า 40% : กากกาแฟ 60%	16.66±4.46	3.71±3.21
T8	ข้าวเจ้า 30% : กากกาแฟ 70%	27.00±2.64	5.67±0.31
T9	ข้าวเจ้า 20% : กากกาแฟ 80%	21.33±2.08	5.08±0.45
T10	ข้าวเจ้า 10% : กากกาแฟ 90%	22.33±2.30	4.78±0.36
T11	ข้าวเจ้า 0% : กากกาแฟ 100%	19.33±9.01	4.82±1.64

แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1.2 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และสารอะดีโนซีน (Adenosine)

สารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนเป็นสารที่พบในรากกลุ่ม Cordyceps มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มพลังงานภายในร่างกาย ใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เช่น โรคหอบหืด วัณโรค โรคหลอดเลือดอักเสบเรื้อรัง โรคไต โรคหัวใจ โรคระบบไหลเวียนโลหิต ความดันโลหิตสูง ภาวะที่เม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปกติโรคนอนไม่หลับ กล้ามเนื้ออ่อนล้า ความเครียด ระบบประสาท เพิ่มภูมิคุ้มกัน (Das et al., 2010)

คอร์ไดเซปิน [Cordycepin (3'-deoxyadenosine)] อยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะกรดนิวคลีอิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษามะเร็ง และต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Antileukemic) มีผลทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory) (Das et al., 2010; Shashidhar et al., 2013) สารออกฤทธิ์ชนิดนี้สร้างโดยเห็ดถั่งเช่าซึ่งปริมาณสารก็จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ในงานวิจัยนี้จะเป็นการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้ข้าวเจ้าและกากกาแฟในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาว่าข้าวเจ้าและกากกาแฟในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อการผลิตสารสำคัญสองชนิดนี้หรือไม่ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 ทำการเปรียบเทียบปริมาณสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ยทั้งหมดที่สกัดได้จากฐานดอกและดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยตัวทำละลายคือ 30.55% เอทานอล พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน มี

ปริมาณสารคอร์โดเซพินแตกต่างกันอย่างมากโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.64-11.27 mg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งในหน่วยทดลองที่ประกอบด้วยข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอน ดักแด่ใหม่เป็นแหล่งโปรตีนหลัก และกากกาแฟเป็นแหล่งโปรตีนเสริม พร้อมทั้งเติมสารอาหารอื่นตามปกติให้ปริมาณสารคอร์โดเซพินสูงที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 11.27 mg/g น้ำหนักแห้ง ปริมาณที่พบนี้สูงกว่าเมื่อเทียบกับรายงานวิจัยอื่นๆ ได้แก่ จากรายงานของ Huang และคณะ(2009) ที่ดักแด่เช่าสีทองมีปริมาณคอร์โดเซพินประมาณ 2.65 mg/g น้ำหนักแห้งและที่ดักแด่เช่าสีทองจากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่มีปริมาณคอร์โดเซพินประมาณ 8.24 mg/g น้ำหนักแห้ง(ธัญญา 2555) ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ดักแด่เช่าสีทอง แหล่งโปรตีน และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างจากในงานวิจัยดังกล่าว

อะดีโนซีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีผลทางเภสัชจลนศาสตร์ และป้องกันการเกิดโรคหัวใจ (Cardioprotection) (Das et al., 2010; Shashidhar et al., 2013) จากตารางที่ 4.2 พบว่าที่ดักแด่เช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในแหล่งโปรตีนเสริมจากธัญพืชที่ต่างกันให้ปริมาณสารอะดีโนซีนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.19-5.77 mg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งการเติมถั่วเหลืองเป็นโปรตีนเสริมทำให้ได้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงกว่าธัญพืชชนิดอื่นๆ (5.77 mg/g น้ำหนักแห้ง) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมีโปรตีนประมาณ 38 g/100g (อรอนงค์, 2535)

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2535. เมล็ดถั่ว พืชหัวและผลิตภัณฑ์ ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัย ส่วนที่ดักแด่เช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในแหล่งโปรตีนที่เป็นไข่จะมีปริมาณสารอะดีโนซีนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.42-17.81 mg/g dw ซึ่งจะเห็นได้ว่าแหล่งโปรตีนที่มาจากแมลงจะเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการสร้างสารอะดีโนซีนได้ดีกว่าแหล่งโปรตีนที่มาจากไข่ ดังนั้นการใช้ทั้งแมลงและไข่เป็นส่วนผสมในสูตรอาหารจึงน่าจะเป็นแนวทางที่น่าสนใจที่จะต้องศึกษาต่อไปในอนาคต ดอกที่ดักแด่เช่าสีทองที่มีสารอะดีโนซีนสูงสุด อยู่ที่ 29.27 mg/g dw คือดอกที่เพาะในเฉพาะจีโอม (รูปที่ 4.4 กลาง) ซึ่งปริมาณสูงกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับที่ดักแด่เช่าสีทองจากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ซึ่งรายงานว่ามีปริมาณอะดีโนซีนประมาณ 0.87 mg/g dw (ธัญญา 2555) ในขณะที่ Huang และคณะ(2009) วัดปริมาณอะดีโนซีนในดอกที่ดักแด่เช่าสีทองที่ได้จากบริษัท ยาได้ 2.45 mg/g dw ซึ่งต่ำกว่าที่พบในงานวิจัยนี้ประมาณ 10 เท่า ซึ่งจากการทดลองพบว่า คอร์โดเซพินและอะดีโนซีนจะมีทั้งในส่วนที่เป็นดอกเห็ด ส่วนของไมซีเลียมซึ่งในอาหารแต่ละชนิดก็จะมีปริมาณสารสำคัญที่ต่างกัน เช่น เฉพาะดักแด่เช่าสีทองมีคอร์โดเซพินในส่วนของไมซีเลียมสูงกว่าส่วนที่เป็นดอกเห็ด แหล่งโปรตีนจากไข่จะมีคอร์โดเซพินในดอกเห็ดสูงกว่าในไมซีเลียม ปริมาณคอร์โดเซพินและอะดีโนซีนที่ผลิตขึ้นโดยที่ดักแด่เช่าสีทองขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะ วิธีการสกัดสาร และอื่นๆ (ธัญญา 2555)

ตารางที่ 9 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และอะดีโนซีน (Adenosine) (mg/g dw) ที่พบในถั่วงาแช่สีทองเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแพต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน

ทรีทเมนต์	องค์ประกอบในอาหารเลี้ยง	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
T1	ข้าวเจ้า 100% : กากกาแพ 0% (control)	28.97±1.59 ^a	4.43±0.18 ^a
T2	ข้าวเจ้า 90% : กากกาแพ 10%	27.93±1.84 ^a	4.12±0.14 ^a
T3	ข้าวเจ้า 80% : กากกาแพ 20%	21.30±1.04 ^{bc}	3.43±0.14 ^{bc}
T4	ข้าวเจ้า 70% : กากกาแพ 30%	22.60±0.99 ^b	3.65±0.10 ^b
T5	ข้าวเจ้า 60% : กากกาแพ 40%	21.20±1.40 ^{bc}	3.14±0.15 ^c
T6	ข้าวเจ้า 50% : กากกาแพ 50%	17.92±1.37 ^{cd}	2.14±0.11 ^d
T7	ข้าวเจ้า 40% : กากกาแพ 60%	16.27±0.95 ^d	2.10±0.09 ^d
T8	ข้าวเจ้า 30% : กากกาแพ 70%	17.29±0.91 ^{cd}	2.08±0.10 ^d
T9	ข้าวเจ้า 20% : กากกาแพ 80%	2.79±0.33 ^e	0.68±0.21 ^e
T10	ข้าวเจ้า 10% : กากกาแพ 90%	4.21±0.35 ^e	0.56±0.04 ^e
T11	ข้าวเจ้า 0% : กากกาแพ 100%	1.49±0.35 ^e	0.22±0.05 ^e

แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 สหสัมพันธ์สำหรับทำนายปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากกาแพที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่วงาแช่สีทอง

จากผลการทดลองการสกัดกากกาแพที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่วงาแช่สีทองภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน คือ ความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัด วิเคราะห์ค่าตอบสนองต่างๆ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลในรูปแบบผิวตอบสนอง จะได้ความสัมพันธ์ของปัจจัยและค่าตอบสนองซึ่งแสดงในรูปแบบของสมการโพลิโนเมียลอันดับสอง (second-order polynomial equation) แสดงดังสมการที่ 1

$$(1) \quad y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j$$

เมื่อ y คือ ค่าใด ๆ เด็ดทั้งหมด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) จากกากกาแพที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วย

ถั่วงาแช่สีทองที่ทำนายได้

β_0 คือ ค่าคงที่หรือสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของจุดตัด (intercept)

β_i คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear)

β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic)

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์อันตรกิริยาระหว่างตัวแปร (interaction terms)

x_i, x_{ii} คือ ปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด

อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัด

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทั้ง 20 ชุดการทดลองเพื่อหาอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดสารจากกากกาแฟผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทองให้ได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณพลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) โดยใช้โปรแกรม Design-expert จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ปัจจัยที่นำมาศึกษาได้แก่ ความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัด พบว่า ความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด และอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) ขณะที่ระยะเวลาที่ใช้สกัดมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณพลาโวนอยด์ทั้งหมด (p-value < 0.05) (Table 9) จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า %CV และค่า R^2 พบว่า Model ซึ่งมีค่า %CV น้อยกว่า 15 และค่า R^2 เข้าใกล้ 1 มีเพียงสามค่าตอบสนองคือ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) ได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังแสดงในสมการที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ

$$Y_{\text{ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด}} = -3339.862 + 75.5081X_1 + 51.84177X_2 + 139.927X_3 - 0.30826X_1X_2 - 1.71320X_1X_3 - 0.63518X_2X_3 - 0.40965X_1^2 - 0.17001X_2^2 - 0.36927X_3^2 \quad (2)$$

$$Y_{\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC)}} = -1.61267 + 0.03708X_1 + 0.18763X_2 + 0.35034X_3 - (2.625 \times 10^{-4})X_1X_2 - (9.888 \times 10^{-4})X_1X_3 + (1.058 \times 10^{-3})X_2X_3 - (1.450 \times 10^{-3})X_1^2 - (1.462 \times 10^{-3})X_2^2 - (7.668 \times 10^{-3})X_3^2 \quad (3)$$

$$Y_{\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging)}} = 191.44778 - 1.93620X_1 - 2.22878X_2 + 1.58960X_3 + 0.022488X_1X_2 + (3.72222 \times 10^{-3})X_1X_3 + (2.89167 \times 10^{-3})X_2X_3 - (6.61212 \times 10^{-3})X_1^2 - (2.97443 \times 10^{-3})X_2^2 - 0.040160X_3^2 \quad (4)$$

โดยที่ X_1 , X_2 และ X_3 คือ Ethanol concentration, Liquid : Solid และ Extraction time ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟีนอลทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเข้าสีทองในสภาวะต่างๆ จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

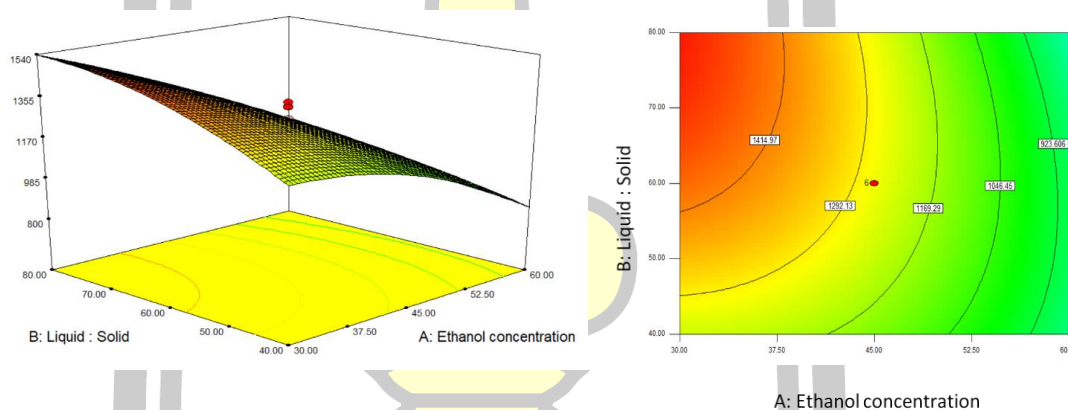
สัญลักษณ์	ปริมาณฟีนอลทั้งหมด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	
			VEAC	% scavenging
X_1	< 0.0001*	0.1260	< 0.0001*	< 0.0001*
X_2	0.0720	0.7085	0.0303*	< 0.0001*
X_3	0.0917	0.0228 *	0.3637	0.3860
X_1X_2	0.0726	0.9307	0.7767	0.0009*
X_1X_3	0.0019*	0.9565	0.6893	0.7778
X_2X_3	0.0656	0.8967	0.5700	0.7701
X_1^2	0.0053*	0.6745	0.0580*	0.0978
X_2^2	0.0258*	0.7348	0.0033*	0.1748
X_3^2	0.4428	0.0150*	0.0179*	0.0197*
C.V. %	11.65	106.01	13.28	8.22
R^2 of model	0.9235	0.6641	0.9307	0.9818

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง

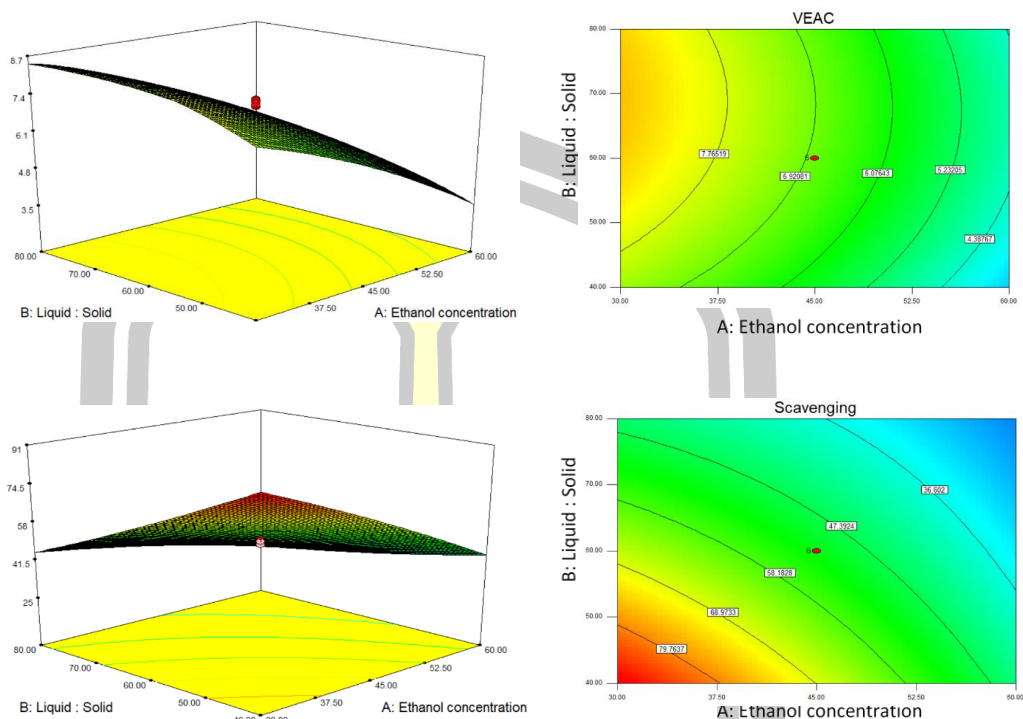
เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงใน Figure 17 โดยปริมาณฟีนอลทั้งหมดจะต่ำลงเมื่อสภาวะในการสกัดมีความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดสูงขึ้น และปริมาณฟีนอลทั้งหมดจะสูงขึ้นเมื่อสภาวะอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างสูงขึ้น โดยความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 30-45 และอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างอยู่ในช่วง 50-80 ml/g ซึ่งจะได้ปริมาณฟีนอลทั้งหมดมากกว่า 1200 mg GAE/100 g dw

ภาพที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ที่พื้นผิวตอบสนองความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (แสดงในหน่วย VEAC และ %Scavenging) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง จากกราฟจะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดต่ำ และอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างเพิ่มขึ้น มีผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (แสดงในหน่วย VEAC) สูงขึ้น แสดงว่าจุดเหมาะสม (optimum) อยู่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 30-45 และอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง อยู่ในช่วง 50-80 ml/g โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้นมากกว่า 6.92 mg VEAC/100 g dw ขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging) เหมาะสมอยู่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 30-45 และอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง อยู่ในช่วง 40-60 ml/g โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้นมากกว่า 60 %Scavenging



ภาพที่ 17 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Liquid : Solid ต่อปริมาณฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง

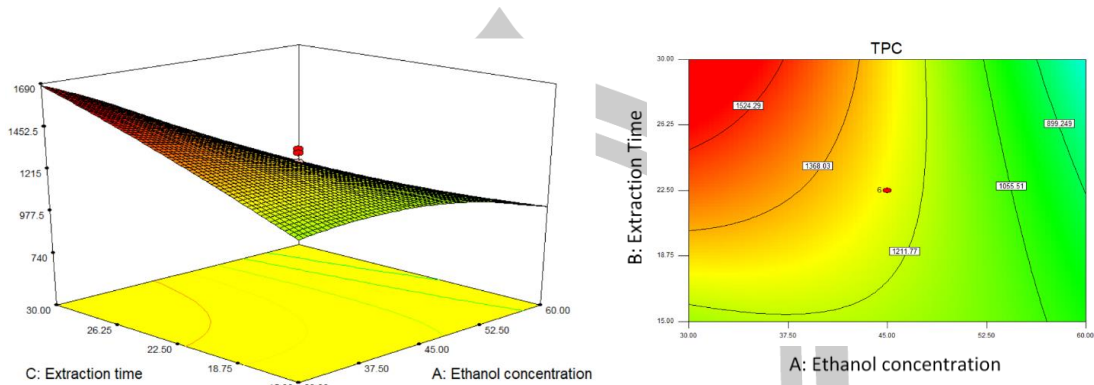
พหุ ประถมศึกษา



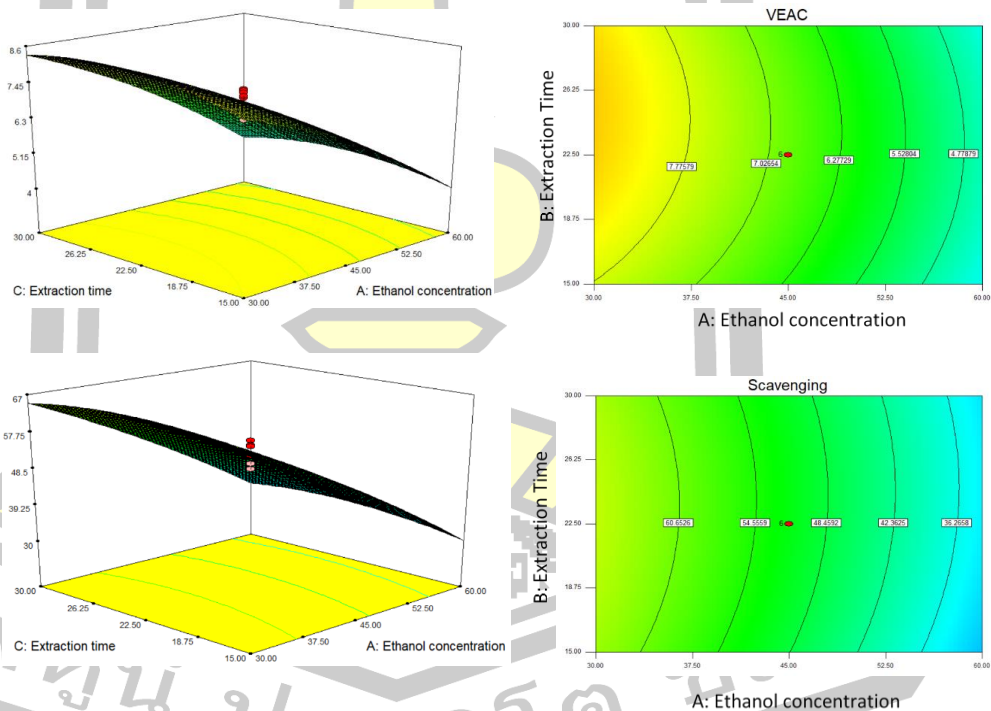
ภาพที่ 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Liquid : Solid ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง

4.2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัดและระยะเวลาที่ใช้สกัด

ภาพที่ 19 แสดงผลการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัดและระยะเวลาที่ใช้สกัด โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะต่ำลงเมื่อสภาวะในการสกัดมีความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัดสูงขึ้น และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น โดยความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้สกัดที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 30-45 และระยะเวลาที่ใช้สกัดอยู่ในช่วง 22-30 นาที ซึ่งจะได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่า 1368 mg GAE/100 g dw



ภาพที่ 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Extraction time ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง



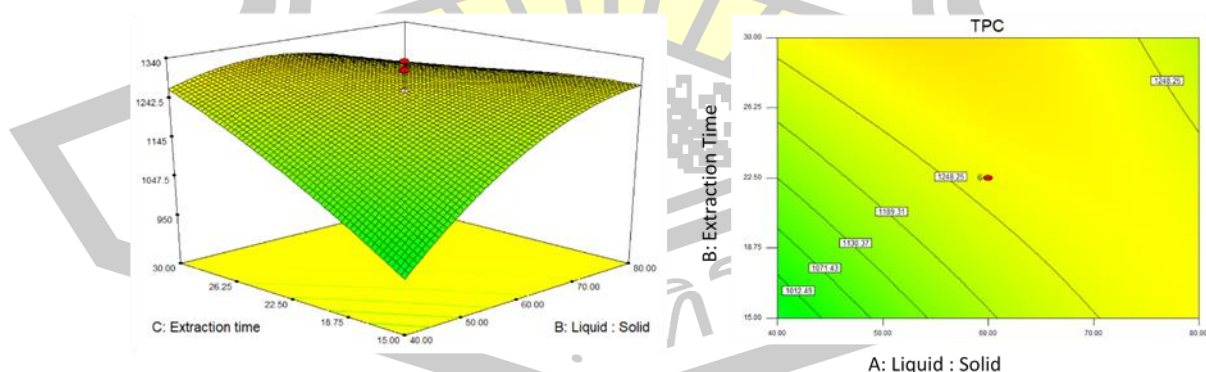
ภาพที่ 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Ethanol concentration และ Extraction time ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง

ภาพที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและระยะเวลาในการสกัดต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mg VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง พื้นผิวที่มีลักษณะเป็นเนินชันขึ้นแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mg VEAC/100 g dw) สูงขึ้น จากกราฟจะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดและระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำลง จากกราฟจุด optimum อยู่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเอธานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 30-37.50 และระยะเวลาในการสกัด อยู่ในช่วง 18-26 นาที

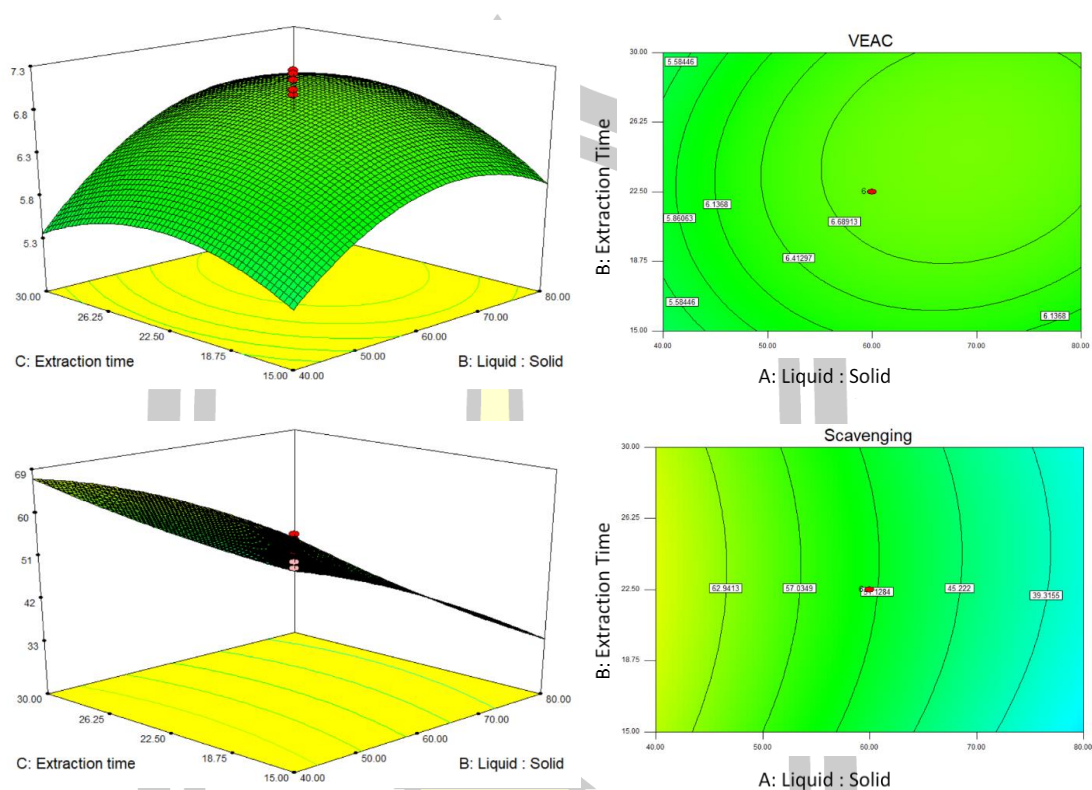
4.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างและระยะเวลาในการสกัด

เมื่อพิจารณากราฟในภาพที่ 21 กราฟพื้นที่ตอบสนองระหว่างปัจจัยอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างและระยะเวลาที่ใช้สกัดต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาที่ใช้สกัดสูงขึ้น ซึ่งอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างอยู่ในช่วง 60-80 ml/g และระยะเวลาที่ใช้สกัดอยู่ในช่วง 18-26 นาที ซึ่งจะได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1200 mg GAE/100 dw

ภาพที่ 22 แสดงผลการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างและระยะเวลาในการสกัดต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mg VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง จากกราฟจะพบว่าจุด optimum อยู่ในบริเวณที่มีอัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างอยู่ในช่วง 60-70 ml/g และระยะเวลาในการสกัดอยู่ในช่วง 22-26 นาที



ภาพที่ 21 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Liquid : Solid และ Extraction time ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง



ภาพที่ 22 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Liquid : Solid และ Extraction time ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ mM VEAC/100 g dw) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH %Scavenging และ VEAC) ของสารสกัดจากกากกาแฟที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถังเช่าสีทอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของของความเข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัดเท่ากับร้อยละ 45 อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างเท่ากับ 60 ml/g และระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 22.50 นาที โปรแกรมได้ทำนายว่าสภาวะดังกล่าวสามารถให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (1263.92 mg GAE/100 dw) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (6.82977 mg VEAC/100 g dw และ 51.7345 %Scavenging) สูงที่สุด (Table 10)

ตารางที่ 11 สภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%Scavenging และ VEAC) ที่ได้จากการทำนายของโปรแกรม

Factor	Name	Level	Low level	High level	Std. Dev.	Coding	
A	Ethanol concentration	45.00	30.00	60.00	0.000	Actual	
B	Liquid : Solid	60.00	40.00	80.00	0.000	Actual	
C	Extraction time	22.50	15.00	30.00	0.000	Actual	
Response	Prediction	SE mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% Pl low	95% Pl high
TPC	1263.92	51.99	1148.09	1379.76	140.33	951.25	1576.60
VEAC	6.82977	0.30	6.15	7.51	0.82	5.00	8.66
%Scavenging	51.7345	1.63	48.10	55.36	4.40	41.94	61.53

4.3 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และสารอะดีโนซีน (Adenosine)

สารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนเป็นสารที่พบในรากกลุ่ม Cordyceps มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเพิ่มพลังงานภายในร่างกาย ใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เช่น โรคหอบหืด วัณโรค โรคหลอดเลือดสมอง โรคหัวใจ โรคไต โรคหัวใจ โรคระบบไหลเวียนโลหิต ความดันโลหิตสูง ภาวะที่เม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปกติโรคนอนไม่หลับ กล้ามเนื้ออ่อนล้า ความเครียด ระบบประสาท เพิ่มภูมิคุ้มกัน (Das *et al.*, 2010)

คอร์ไดเซปิน [Cordycepin (3'- deoxyadenosine)] อยู่ในกลุ่มสารปฏิชีวนะกรดนิวคลีอิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการรักษามะเร็ง และต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Antileukemic) มีผลทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunomodulatory) (Das *et al.*, 2010; Shashidhar *et al.*, 2013) สารออกฤทธิ์ชนิดนี้สร้างโดยเห็ดถั่งเช่าซึ่งปริมาณสารก็จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ในงานวิจัยนี้จะเป็นการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้ข้าวเจ้าและกากกาแฟในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษาว่าข้าวเจ้าและกากกาแฟในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อการผลิตสารสำคัญสองชนิดนี้หรือไม่ได้ผล ดังแสดงในตาราง 12 ทำการเปรียบเทียบปริมาณสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ยทั้งหมดที่สกัดได้จากฐานดอกและดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยตัวทำละลายคือ 45% เอทานอล อัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อตัวอย่างเท่ากับ 60 ml/g และระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 22.50 นาที พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่ 60%-80% มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงถึง 8069.03, 8759.04 และ 7635.56 mg/kg ตามลำดับ เมื่อเทียบกับรายงานวิจัยอื่นๆ ได้แก่ จากรายงานของ Huang และคณะ(2009) เห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณคอร์ไดเซปินประมาณ

2.65 mg/g น้ำหนักแห้ง และเห็ดถั่งเช่าสีทองจากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่มีปริมาณคอร์ไดเซปินประมาณ 8.24 mg/g น้ำหนักแห้ง (ธัญญา, 2555) ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง แหล่งโปรตีน และสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างจากในงานวิจัยดังที่กล่าวมา

ตารางที่ 12 ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) (mg/kg dw) และอะดีโนซีน (Adenosine) (mg/kg dw) ที่พบในถั่งเช่าสีทองเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน

สัดส่วนกากกาแฟ (%)	ฐานถั่งเช่า		ดอก	
	Cordycepin (mg/kg dw)	Adenosine (mg/kg dw)	Cordycepin (mg/kg dw)	Adenosine (mg/kg dw)
0 (control)	1611.00	942.95	1813.98	3649.26
10	3858.32	673.89	4129.62	5540.28
20	5469.55	1772.94	2439.90	6284.21
30	1835.67	214.24	2744.50	6535.50
40	985.67	4.96	2867.05	6521.32
50	1114.79	475.23	5851.46	8413.70
60	3957.84	467.19	8069.03	13209.89
70	4113.376	593.16	8759.04	13606.26
80	230.98	93.89	7635.56	9363.92
90	nd	295.74	7241.88	8391.12
100	nd	316.95	7138.69	7775.32

อะดีโนซีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีผลทางเภสัชจลนศาสตร์ และป้องกันการเกิดโรคหัวใจ (Cardioprotection) (Das *et al.*, 2010; Shashidhar *et al.*, 2013) จาก Table 11 พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในกากกาแฟที่สัดส่วนที่ 60%-70% ให้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงที่สุดถึง 13209.89, 13606.26 และ 9363.92 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองพบสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนทั้งในส่วนที่เป็นดอกเห็ดและส่วนที่เป็นฐานถั่งเช่า จากงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ซึ่งรายงานว่ามีปริมาณอะดีโนซีนประมาณ 0.87 mg/g dw (ธัญญา, 2555) ในขณะที่ Huang และคณะ (2009) วัดปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากบริษัทยาได้ 2.45 mg/g dw ซึ่งปริมาณคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีนที่ผลิตขึ้นโดยเห็ดถั่งเช่าขึ้นอยู่กับ

ปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร สภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะ วิธีการสกัดสาร และอื่นๆ (ธัญญา, 2555)

4.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และผลการวิเคราะห์ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จัดเป็นสารทุติยภูมิประเภทหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถพบได้ในพืชหลายชนิดและสามารถพบได้ในเห็ดถึงเช่าสีทองเช่นเดียวกัน จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocaltean assay พบว่าสัดส่วนกากกาแฟที่ 10% - 80% นั้นมีปริมาณฟีนอลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม คือการใช้อาหารเลี้ยงเป็นข้าวเจ้าอย่างเดียว โดยในดอกเห็ดถึงเช่าพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 43.27 ± 3.56 mg GAE/g dw และในฐานถึงเช่าพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 5691.490 ± 138.47 (ตารางที่ 13) ชุดिमณฑน์ พลอยประดับ และคณะ (2553) รายงานไว้ว่าส่วนต่างๆ ของกาแฟมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.60-14.20 mg GAE/g ได้แก่ เนื้อผลสด 9.60 mg GAE/g เมล็ดกาแฟ 14.20 mg GAE/g เนื้อผงกาแฟ 12.20 mg GAE/g และกากกาแฟ 3.60 mg GAE/g การเพาะเลี้ยงถึงเช่าด้วยกากกาแฟจะส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกสูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโครงสร้างของสารโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่มแทนนินที่มีอยู่ในกากกาแฟให้ได้โมโนเมอร์ได้แก่ กรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทำให้มีปริมาณสูงขึ้นเมื่อผ่านการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าสัดส่วนกากกาแฟที่ 70% มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 15.95 ± 0.38 mg GAE/g dw รองลงมาคือสัดส่วนกากกาแฟที่ 50%-60% และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 14.20 ± 0.47 และ 14.52 ± 0.48 mg GAE/g dw ตามลำดับ และในฐานถึงเช่าพบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 1758.364 ± 59.53 ในสัดส่วนกากกาแฟที่ 90% ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่าสัดส่วนของกากกาแฟที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เนื่องจากในกากกาแฟมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่ เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยเอนไซม์จากเส้นใยเห็ดถึงเช่าสีทองจะย่อยสลายกากกาแฟมากขึ้น ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจึงสูงขึ้นตามไปด้วย

ตารางที่ 13 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในถั่วงอกที่หมักเลี้ยงด้วยกากกาแฟ

สัดส่วนกาก กาแฟ (%)	ฐานถั่วงอก		ดอก	
	TPC	TFC	TPC	TFC
	(mg GAE/g DW)	(mg RU/g DW)	(mg GAE/g DW)	(mg RU/g DW)
0 (control)	34.25±1.39 ^e	1.41±0.04 ^g	10.62±0.00 ^{ab}	6.10±0.18 ^d
10	35.98±0.51 ^{de}	3.95±0.40 ^{ef}	10.88±0.53 ^{ab}	6.86±0.10 ^d
20	37.18±2.24 ^{de}	3.74±0.12 ^f	10.71±1.60 ^{ab}	9.27±0.16 ^c
30	40.43±0.99 ^{cd}	4.61±0.08 ^e	8.46±0.22 ^{ab}	9.62±0.22 ^c
40	45.85±1.05 ^b	7.20±0.12 ^d	8.55±0.39 ^{ab}	9.46±0.10 ^c
50	56.91±1.38 ^a	7.69±0.12 ^{cd}	43.27±3.56 ^a	14.20±0.47 ^b
60	36.25±0.52 ^{de}	16.32±0.04 ^b	17.11±0.83 ^{ab}	14.52±0.48 ^b
70	43.24±0.44 ^{bc}	8.04±0.04 ^c	22.46±1.45 ^{ab}	15.95±0.38 ^a
80	38.17±0.92 ^{de}	16.09±0.19 ^b	7.69±0.31 ^{ab}	11.09±0.53 ^c
90	46.19±0.73 ^b	17.58±0.59 ^a	4.06±0.76 ^b	9.53±0.14 ^c
100	47.56±3.38 ^b	16.02±0.15 ^b	5.96±0.89 ^b	9.09±0.26 ^c

อักษร a, b, c, d และ e ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay คิดเป็น %scavenging โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากเมื่อ DPPH จากสีม่วงจะจางลง โดยการวิเคราะห์ครั้งนี้พบว่า สัดส่วนกากกาแฟที่ใช้เพาะเลี้ยงถั่วงอกที่ 70% ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 11.84 ± 0.65 mg TE/g dw ทั้งในฐานเห็ดถั่วงอกและในดอกเห็ดถั่วงอก ส่วนการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP พบว่าสัดส่วนของกากกาแฟที่ใช้ 50% - 80% มีกิจกรรมการรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP สูงที่สุดที่ 4.00 ± 0.08 mg Fe(II)/g ตัวอย่างแห้ง (ตารางที่ 14) และในฐานถั่วงอกพบว่า มีกิจกรรมการรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP สูงที่สุดที่ 3.82 ± 0.08 mg Fe(II)/g ตัวอย่างแห้ง ที่สัดส่วนกากกาแฟ 50%-90% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับสัดส่วนอื่น หรือเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สัดส่วนกาก กาแฟ (%)	ฐานถั่งเช่า		ดอก	
	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH
	(mg Fe(II)/g DW)	(mg TE/g DW)	(mg Fe(II)/g DW)	(mg TE/g DW)
0 (control)	2.52±0.02 ^d	7.76±0.44 ^{cd}	3.20±0.08 ^d	7.76±0.44 ^{cd}
10	3.10±0.09 ^{bc}	7.53±0.26 ^d	3.25±0.06 ^{cd}	7.53±0.26 ^d
20	2.96±0.04 ^c	9.50±0.37 ^{bcd}	3.53±0.13 ^b	9.50±0.37 ^{bcd}
30	3.24±0.02 ^{bc}	10.16±0.62 ^{ab}	3.60±0.05 ^b	10.16±0.62 ^{ab}
40	3.16±0.06 ^{bc}	7.81±0.75 ^{cd}	3.58±0.04 ^b	7.81±0.75 ^{cd}
50	3.72±0.12 ^a	7.81±0.56 ^{cd}	3.94±0.05 ^a	7.81±0.56 ^{cd}
60	3.06±0.01 ^{bc}	9.32±0.53 ^{bcd}	3.98±0.06 ^a	9.32±0.53 ^{bcd}
70	3.68±0.05 ^a	11.84±0.65 ^a	4.00±0.08 ^a	11.84±0.65 ^a
80	3.82±0.08 ^a	9.78±0.40 ^{bc}	3.95±0.10 ^a	9.78±0.40 ^{bc}
90	3.59±0.09 ^a	9.13±1.15 ^{bcd}	3.25±0.04 ^{cd}	9.13±1.15 ^{bcd}
100	3.31±0.06 ^b	11.13±0.53 ^{ab}	3.48±0.05 ^{bc}	11.13±0.53 ^{ab}

อักษร a, b, c, และ d ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองด้วยกากกาแฟเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ โดยแบ่งสัดส่วนกากกาแฟและข้าวเป็น 0 (control) 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปเลี้ยงในห้องที่อุณหภูมิ 20 °C ในที่มีดจนเชื้อเจริญเต็มขวดใช้เวลาประมาณ 7-14 โดยน้ำหนัก จากนั้นให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อเร่งการเกิดดอกและเก็บเกี่ยวผลผลิต ศึกษาการสกัดตัวอย่างโดยใช้วิธีปั่นผิวตบสนองและออกแบบการทดลองแบบผสมกลาง ได้แก่ ความ

เข้มข้นของเอธานอลที่ใช้สกัด อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่าง และระยะเวลาในการสกัด วิเคราะห์ค่าตอบสนองต่างๆ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (VEAC และ %scavenging) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดตัวอย่าง กากกาแฟผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยถั่งเช่าสีทอง คือ สกัดตัวอย่างด้วยเอธานอลเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 45 อัตราส่วนระหว่างเอธานอลต่อตัวอย่างเท่ากับ 60 ml/g และระยะเวลาในการสกัดเท่ากับ 22.50 นาที จากการทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สัดส่วนของกากกาแฟต่อข้าวเจ้าที่แตกต่างกัน พบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในกากกาแฟที่สัดส่วน 60%-80% มีปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีนในดอกเห็ดสูงใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 8069.03, 8759.04 และ 7635.56 mg/kg dw และ 13209.89, 13606.26 และ 9363.92 mg/kg dw ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองด้วยข้าวอย่างเดียวนั้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงด้วยสัดส่วนกากกาแฟที่สูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่ออายุของดอกเห็ดที่ต่ำลง ดังนั้น สัดส่วนกากกาแฟที่ 70% โดยน้ำหนัก จึงเหมาะสมที่สุดที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง ซึ่งได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในดอกเห็ดเท่ากับ 8759.04 และ 13606.26 mg/kg dw ตามลำดับ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 22.46 mg GAE/g dw และ 15.95 mg RU/g dw และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP และ DPPH เท่ากับ 4.00 mg Fe(II)/g dw และ 11.84 mg TE/g dw ตามลำดับ

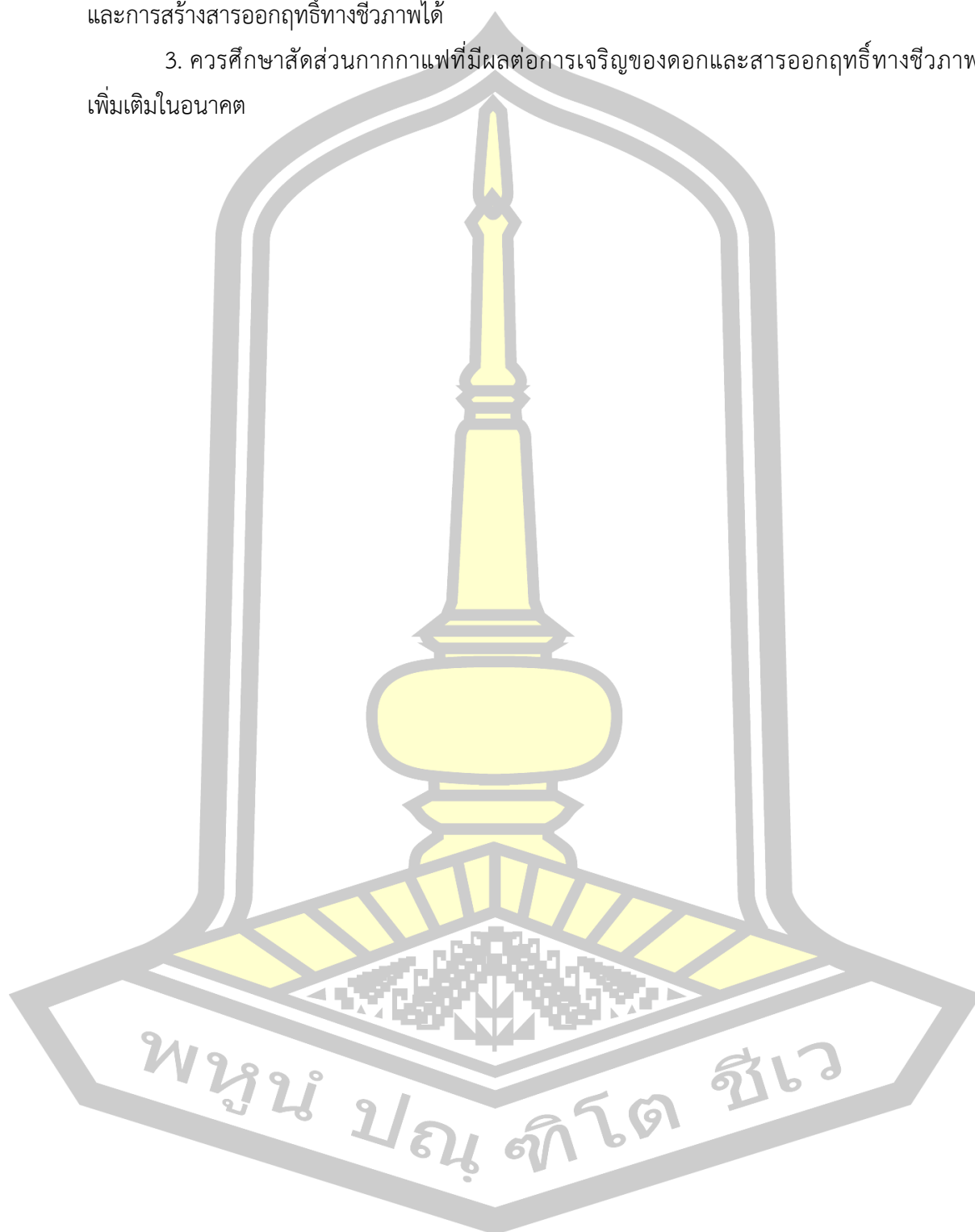
ข้อเสนอแนะ

1. การใช้กากกาแฟเป็นอาหารเลี้ยงในสัดส่วนที่ 80%-100% นั้นมีความชื้นสูงและความหนาแน่นของกากกาแฟมากเกินไป ทำให้อาหารที่เพาะเลี้ยงจับกันเป็นก้อนแน่น เนื่องจากกากกาแฟดูดซับของเหลวจึงทำให้ดอกเห็ดเจริญได้ไม่ดี การเตรียมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจึงควรปรับสัดส่วนให้เหมาะสมต่อไป

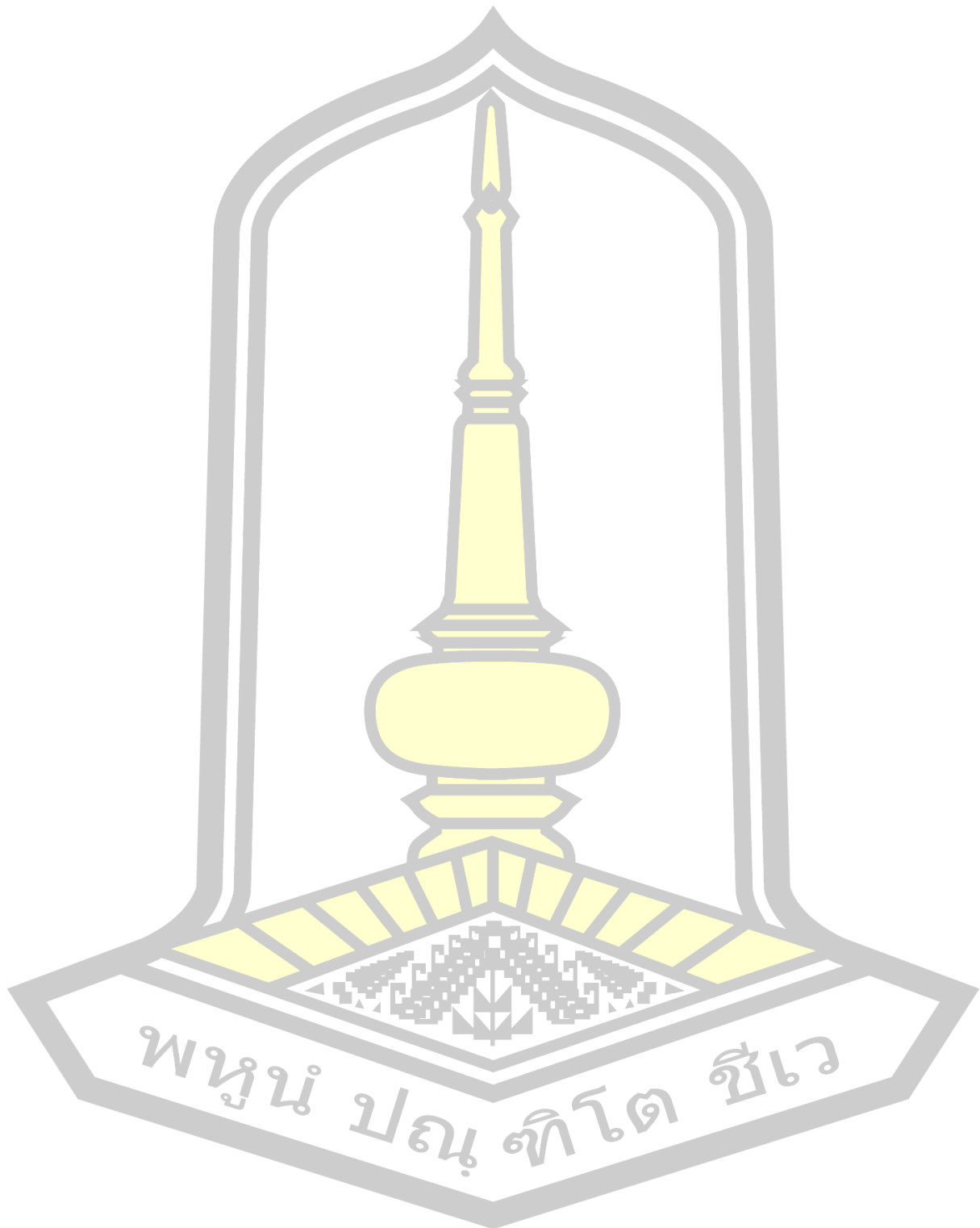
2. เนื่องจากถั่งเช่าเจริญได้ดีในที่ที่อุณหภูมิต่ำ ในการเพาะเลี้ยงจึงจำเป็นต้องเปิดเครื่องปรับอากาศตลอดเวลาในช่วงการเพาะเลี้ยง ดังนั้นหากมีเหตุการณ์ที่ทำให้ไฟดับในระหว่างการ

เพาะเลี้ยงอาจทำให้อุณหภูมิและแสงสว่างในการเลี้ยงไม่สมบูรณ์ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญของดอกและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

3. ควรศึกษาสัดส่วนกากกาแฟที่มีผลต่อการเจริญของดอกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมในอนาคต



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- จรัส ทรัพย์เสรี. (2552). DOE Central Composite Design. ค้นเมื่อ 2 กันยายน 2564 จาก www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/FQ145_p72-74.pdf
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ. กรุงเทพฯ: ฟูโพร่ พรินต์ติ้ง
- ธัญญา ทะพิงค์แก ยะไชย ศุภชัย และวรรณพร ทพพิงค์แก. 2556. รายงานวิจัยเรื่อง ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- พิงค์แก มงคล ยะไชย ศุภชัย ศรีธวัช กัญจน์พัชร อุปลศิลป์ อภริดา พรปิ่นณวิษณุ อภิขญา ทองทับ และวรรณพร ทะพิงค์แก. (2557). การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรถั่งเช่าสีทองและการนำไปใช้ประโยชน์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.).
- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่ตอบสนอง, พิมพ์ครั้งที่ 1 ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- รพีพรรณ กองตุม. (2560) กากกาแฟ: มูลค่าเพิ่มและการใช้ประโยชน์. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5 การประชุมระดับชาติ
- วันทนา นาคีสรินทร์ และนภวรรณ รัตสุข. (2556). การใช้กากกาแฟทดแทนซีลี้อยู่ในการเพาะเห็ดนางรมฮังการี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- อนุวัตร แจ้งชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- Aguilar, C.N. and Gutierrez-Sanchez, G. (2001). Review sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Science and Technology International*, 7: 373-382.
- Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M. and Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, 96: 70-76.
- Aryuman, P. and Hanmoungjai, P. (2006). The utilization of agricultural wastes for tannase production. *Thai Journal of Biotechnology*, 7: 8-12.
- Asia Herbal Biotech. (2009). Benefits of Cordyceps. [Online]. Available: <http://ahb2u.blogspot.com/>. (12 May 2010)

- Banerjee, R., Mukherjee, G. and Patra, K.C. (2005). Microbial transformation of tanninrich substrate to gallic acid through co-culture method. *Bioresource Technology*, 96: 949-953.
- Battestin, V. and Macedo, G.A. (2007). Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*, 98: 1832-1837.
- Bentley, H.R., Cunningham, K.G. and Spring, F.S. (1951). Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) link. Part II. The structure of cordycepin. *J. Chem. Soc.*, 2301-2305.
- Benzie, I.F., and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76.
- Bok, J.W., Lerner, L., Chilton, J. (1999). Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochem.* 51: 591-898.
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H.A. and Oomah, B.D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45: 24-36.
- Chang, S.T and Hayes, W.A. (1978). *The Biology and Cultivation of Edible Mushroom*. London, Academic Press.
- Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S., Wang, S.Y. (1997). Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci*, 60: 2349-2359.
- Chen, Y.-S., Liu, B.-L., Chang, Y.-N. (2011). Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean J. Chem. Eng.*, 28: 875-879.
- Das, S. K., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M. (2010). Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 81, 961-968.
- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom and R.H. Liu. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50, 3010-3014.
- Fan, L. and Soccol, C.R. (2005). Shiitake bag cultivation part I shiitake: coffee residues. *Shiitake cultivation in Mushroom Growers' Handbook 2*. pp. 92-95.

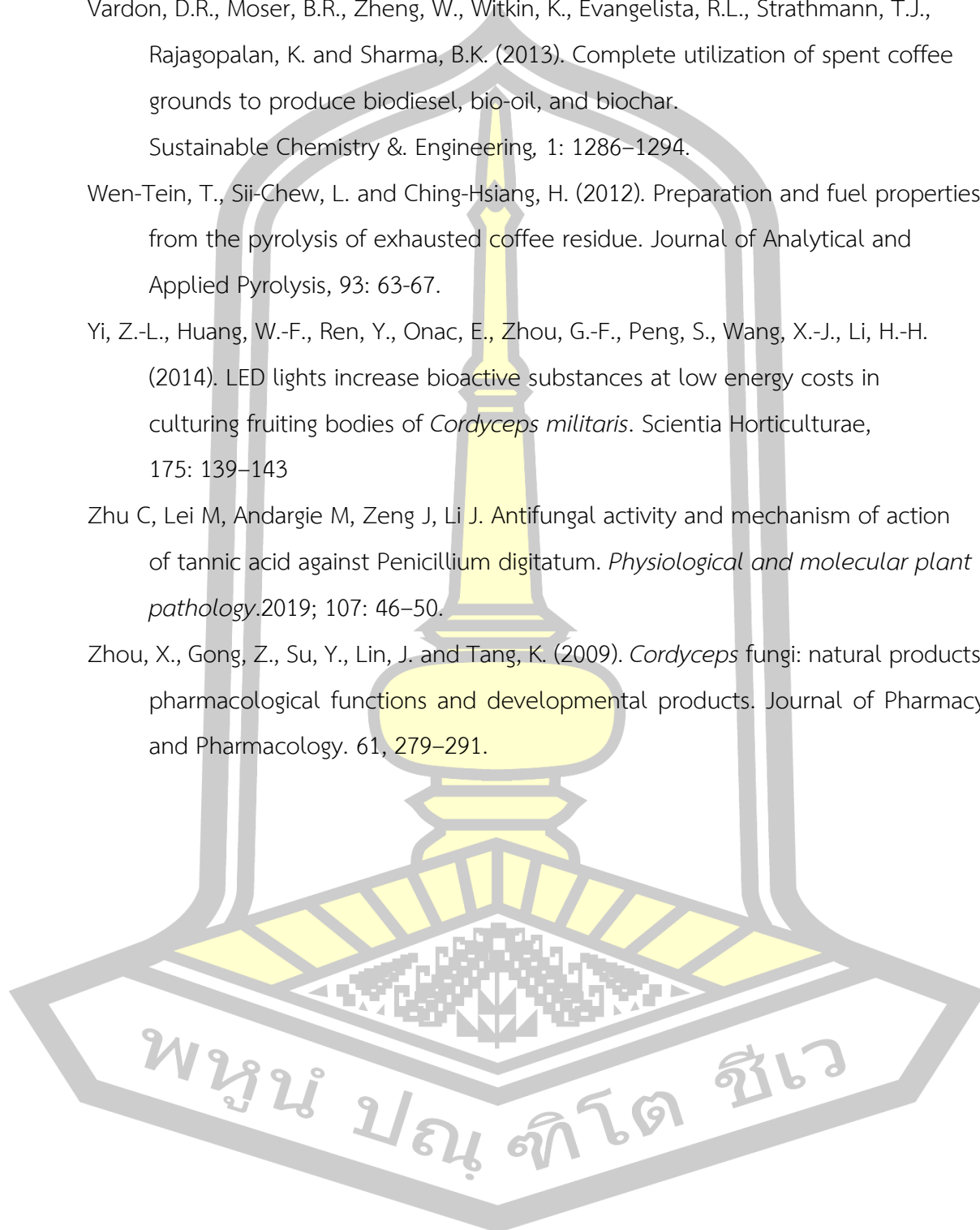
- Hadi, T.A., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B.C. (1994). Optimization of tannase biosynthesis by newly isolated *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess Engineering*, 11: 239–243.
- Hardgrove, S.J. and Livesley, S.J. (2016). Applying spent coffee grounds directly to Urban agriculture soils greatly reduces plant growth. *Urban Forestry & Urban Greening*, 18: 1-8.
- Haslam, E. and Tanner, R.J.N. (1970). Spectrophotometric assay of tannase. *Phytochemistry*, 9: 2305-2309.
- Haggerman, A.E. and Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 809–812.
- Hodge, K.T.; Krasnoff, S.B., & Humber, R.A. (1996). *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis*. *Mycologia*, 88, 715-719.
- Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X. and Zhou, X. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 957-961.
- Hung, Y.-P., Wang, J.-J., Wei, B.-L., Lee, C.-L. (2015). Effect of the salts of deep ocean Water on the production of cordycepin and adenosine of *Cordyceps militaris* fermented product. *AMB Expr*, 5: 53.
- Hywel-Jones, N. L. (1994). *Cordyceps khaoyaiensis* and *C. pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. *Mycological Research*, 98: 939-942.
- Isaka, M. Tanticharoen, M. (2001). Structures of cordyopyridones A-D, antimalarial N-hydroxy and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. *J. Org. Chem.* 66: 4803-4808.
- Janissen, B., Huynh. T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. *Resources, Conservation & Recycling*, 128: 110–117.
- Jaturapat, A., Isaka, M., Hywel-Jones, N.L. (2001). Bioanthracenes from the insect pathogenic fungus *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. I. Taxonomy, fermentation, isolation and antimalarial activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 54: 29-35.

- Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S. and Ukai, S. (1996). Polysaccharide in fungi, XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 294-296.
- Kittakoop, P., Punya, J., Kongsaree, P., Lertwerawat, Y., Jintasirikul, A., Tantichareon, M., Thebtaranonth, Y. (1999). Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. *Phytochem.* 52: 453-457.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S.K. and Misra, M. (2008). Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56: 11757-11760.
- Kyung-Won, J., Choi, B.H., Min-Jin, H., Tae-Un, J. and Kyu-Hong, A. (2016). Fabrication of granular activated carbons derived from spent coffee grounds by entrapment in calcium alginate beads for adsorption of acid orange 7 and methylene blue. *Bioresource Technology*, 219: 185-195.
- Lekha, P.K. and Lonsane, B.K. (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase; State of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 44: 215-260.
- Liu, X., Huang, K., Zhou, J. (2014). Composition and antitumor activity of the mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2: 74-79.
- Mani, A., Patel, J., Kalam, S., Singh, R., Sandhu, S.S. (2015). Evaluation of mycelial and exo-polysaccharide production from *Cordyceps militaris*. *Int. Journal of Applied Sciences and Engineering Research*, 4: 609-619.
- Martinez-Saeza, N., García, A.T., Pérez, I.D., Rebollo-Hernanz, M., Mesías, M., Morales, F.J., Matin-Cabrejas, M.A. and Doloresdel Castillo, M. (2017). Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. *Food Chemistry*, 216: 114-122.
- Montgomery, D.C. (2013). *Design and analysis of experimentals*, 8th ed., John Wiley & Sons, Inc. Mueller-Harvey, I., Reed, J.D. and Hartley, L.D. (1987). Characterization of phenolic compounds, including tannins of ten ethiopian browse species by

- high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39: 1–14.
- Mukharjee, G. and Banerjee, R. (2003). Production of gallic acid: Biotechnological routes (Part 1). *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 21: 59–62.
- Mussatto, S.I., Carneiro, L.M., João, P.A. Silva, Inês C. Roberto, and José A. Teixeira. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83: 368–374.
- Nagai, T., Myoda, T. & Nagashima, T. 2005. Antioxidative activities of water extract and ethanol extracts from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry* 91: 389–394.
- Niehaus, J.U. and Gross, G.G. (1997). A gallotannin degrading esterase from the leaves of *Penduculate oak*. *Phytochemistry*, 45: 1555–1560.
- Passus, C.P. and Coimbra, M.A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 84: 626–633.
- Patricia, E. and Victor, M.J. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46: 488–495.
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C. and Pandey, A. (2006). Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 575–580.
- Simões, J., Nunes, F.M., Domingues, M.R. and Coimbra, M.A. (2013). Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. *Carbohydrate Polymers*, 97: 81–89.
- Singleton, V. L. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsaard, J. J., Shrestha, B. and Spatafora, J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 57, 5–59.
- USDA. Coffee: World Markets and Trade. In: United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. (online) Available:

<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>. [December 2014].

- Vardon, D.R., Moser, B.R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R.L., Strathmann, T.J., Rajagopalan, K. and Sharma, B.K. (2013). Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *Sustainable Chemistry & Engineering*, 1: 1286–1294.
- Wen-Tein, T., Sii-Chew, L. and Ching-Hsiang, H. (2012). Preparation and fuel properties from the pyrolysis of exhausted coffee residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 93: 63-67.
- Yi, Z.-L., Huang, W.-F., Ren, Y., Onac, E., Zhou, G.-F., Peng, S., Wang, X.-J., Li, H.-H. (2014). LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*, 175: 139–143
- Zhu C, Lei M, Andargie M, Zeng J, Li J. Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. *Physiological and molecular plant pathology*.2019; 107: 46–50.
- Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. and Tang, K. (2009). *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61, 279–291.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุดารัตน์ ทะสุญ
วันเกิด	วันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ.2537
สถานที่เกิด	อำเภอโพนทอง จังหวัดร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 96 หมู่ 12 ตำบลวังสามัคคี อำเภอโพนทอง จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45110
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนโพนทองวิทยายน พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2565 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูนัน ปณุกิตโต ชีวะ