บทความวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมของการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือในน้ำลำไย

นักรบ นาคประสม และ กาญจนา นาคประสม*
สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0 5387 5000-15 ต่อ 139 อีเมล: narkprasom@gmail.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2024.03.012
รับเมื่อ 21 มกราคม 2564 แก้ไขเมื่อ 21 มีนาคม 2565 ตอบรับเมื่อ 26 เมษายน 2565 เผยแพร่ออนไลน์ 29 มีนาคม 2567
© 2024 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

ลำไยเป็นผลผลิตทางการเกษตรของภาคเหนือประเทศไทยที่มีผลผลิตมาก ราคาตกต่ำ และขาดนวัตกรรมเพื่อเพิ่มมูลค่า ในสถานการณ์โควิด 19 มีความต้องการอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำลำไยมาเป็นแหล่งพลังงานของราเห็ดหลินจือใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตเส้นใยโดยกระบวนการหมักในอาหารเหลว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือในน้ำลำไย ปัจจัยในการศึกษาประกอบด้วยปริมาณของน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์, น้ำตาลทราย, หางนม, $CaCO_3$, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ และกล้าเชื้อ การคัดเลือกตัวแปรโดยวิธี Plackett Burman Design การหาช่วงที่เหมาะสมโดยวิธี Steepest Ascent และการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ การทดลองพบว่า น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ (251.549 มิลลิลิตรต่อลิตร) และหางนม (14.226 กรัมต่อลิตร) เป็นปัจจัยที่สำคัญและผลิตไมซีเลียมหลินจือน้ำหนักแห้งสูงสุด 36.636 กรัมต่อลิตร ในขณะที่องค์ประกอบอื่นๆของอาหารที่หมักในอาหารเหลวมีดังนี้ ปริมาณน้ำตาล 7.5 กรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 0.6 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.75 กรัมต่อลิตร กล้าเชื้อ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร งานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์เสริมภูมิคุ้มกันจากธรรมชาติ

คำสำคัญ: เห็ดหลินจือ การหมักในอาหารเหลว ลำไย การหาสภาวะที่เหมาะสม

การอ้างอิงบทความ: นักรบ นาคประสม และ กาญจนา นาคประสม, "*สภาวะที่เหมาะสมของการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือในน้ำลำไย*," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 34, ฉบับที่ 2, หน้า 1–10, เลขที่บทความ 242-175766, เม.ย.–มิ.ย. 2567.

วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 เม.ย.–มิ.ย. 2567
The Journal of KMUTNB., Vol. 34, No. 2, Apr.–Jun. 2024

Research Article

Optimization of Submerged Fermentation for *Ganoderma lucidum* Mycelium in Longan Juice

Nukrob Narkprasom and Kanjana Narkprasom*
Affiliation Division of Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0 5387 5000-15 Ext. 139, E–mail: narkprasom@gmail.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2024.03.012
Received 21 January 2021; Revised 21 March 2022; Accepted 26 April 2022; Published online: 29 March 2024
© 2024 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Longan is an agricultural product of northern Thailand with high yields, low prices, and a lack of innovation to add value. In the Covid–19 situation, there is a need for food to stimulate immunity, so longan was used as a source of energy for *Ganoderma lucidum* fungi for growth and mycelium production. The objective of this research was to determine the optimum conditions for fermentation of *Ganoderma lucidum* mycelium in longan juice. The factors were the quantity of 9 brix longan juice, sucrose, skim milk, $CaCO_3$, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$ and inoculate culture. Variables by Plackett Burman Design method, optimal range by the Steepest ascent method and optimization by the response surface method were used in the statistical analysis. It was found that 9 brix longan juice (251. 549 ml/ l) and skim milk (14. 226 g/ l) were important factors and produced the highest dry weight of *Ganoderma lucidum* mycelium at 36. 636 g/ l while the other composition of the medium used in submerged fermentation was as follows: 7. 5 g/ l sucrose, 0. 6 g/ l $CaCO_3$, 0. 75 g/ l KH_2PO_4, 0.75 g/l $MgSO_4.7H_2O$, and 50 ml/l inoculate culture. This research can be applied in functional beverages, food supplements and natural immune-boosting products.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Submerged Fermentation, Longan, Optimization

Please cite this article as: N. Narkprasom and K. Narkprasom, "Optimization of submerged fermentation for *Ganoderma lucidum* mycelium in longan juice," *The Journal of KMUTNB*, vol. 34, no. 2, pp. 1–10, ID. 242-175766, Apr.–Jun. 2024 (in Thai).

1. บทนำ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคเหนือของประเทศไทย ที่มีส่วนประกอบทางโภชนาการมากมายและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ เนื้อของลำไยสามารถนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณ ทำให้ร่างกายสดชื่น ลดความเหนื่อยล้า รักษาอาการนอนไม่หลับ และอาการใจสั่น โดยพอลิแซ็กคาไรด์ในลำไยมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างรวมถึงสารต้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ควบคุมจุลินทรียในลำไส้ [1] แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตทางการเกษตรของลำไย มีพื้นที่ในการเพาะปลูกมาก ทำให้ในบางปีที่อุดมสมบูรณ์จะมีผลไม้ปริมาณมากล้นตลาด หรือมีคุณภาพต่ำ ขนาด รูปทรงไม่เป็นที่ต้องการสำหรับผู้บริโภค ทำให้ราคาตกต่ำ เกษตรกรชาวสวนจึงต้องแปรรูปเพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาและเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรโดยการนำไปลำไยอบแห้ง ลำไยในน้ำเชื่อม แต่กระบวนการดังกล่าวทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จำนวนมาก ทำให้มีราคาถูกจากกลไกตลาด และขาดนวัตกรรมเพื่อเพิ่มมูลค่า

ลำไยนั้นอุดมไปด้วยแหล่งคาร์โบไฮเดรตของโมเลกุลแซคคาไรด์หลายชนิดในเนื้อลำไย ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุกโตส มานโนส อาราบิโนส ไซโลส กาแลคโตส และน้ำตาลหายากบางชนิด [2] ที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในการเจริญเติบโต โดยในต่างประเทศนิยมนำผลไม้ที่มีความหวานมาหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อทำไวน์จากผลไม้ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีผลเสียต่อร่างกาย อีกทั้งระเบียบข้อกฎหมายไม่สนับสนุนให้ผู้ประกอบการรายย่อยแปรรูปด้วยวิธีดังกล่าว ซึ่งอาจต้องเติมอากาศในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดจนได้ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมัก แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการดังกล่าวต้องมี 2 ขั้นตอน คือ การหมักและการเติมอากาศ ทำให้ใช้เวลามากขึ้น อีกทั้งผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักยังไม่เป็นที่นิยมในประเทศไทย ดังนั้นการหมักโดยเปลี่ยนเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อราเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ที่มีประโยชน์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเห็ดทางยานี้ได้รับความสนใจในการวิจัยอย่างกว้างขวางว่าเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการและยาเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย [3]–[5]

ในปัจจุบันสถานการณ์โควิด–19 เป็นเชื้อไวรัสที่ระบาดทั่วโลกจึงทำให้มีแนวคิดที่จะนำผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นแหล่งคาร์บอน มาพัฒนาเป็นผลิตเครื่องดื่มกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยใช้กระบวนการหมักด้วยเห็ดราที่มีสรรพคุณทางยา มีงานวิจัยรายงานว่า เห็ดราหลายชนิดรวมถึงเห็ดหลินจือมีศักยภาพในการรักษา โดยที่สารเบต้ากลูแคนจากเห็ดมีประสิทธิภาพในการต้านไวรัส นอกจากนี้สารสกัดเทอร์พีนอยด์ และโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดมีแนวโน้มว่าจะเป็นยาป้องกันโรคหรือรักษาโรคโควิด–19 [6] อย่างไรก็ตามผลเห็ดหลินจือ (Fruiting Body) ใช้ระยะเวลาเพาะปลูกหลายเดือน ในโรงเรือน และการนำเห็ดหลินจือแห้งต้มสกัดด้วยน้ำร้อนนั้นมีรสชาติขม ทำให้ไม่เป็นที่นิยมสำหรับกลุ่มผู้บริโภค แต่การหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือในอาหารเหลวใช้เวลาสั้น ลดการปนเปื้อนจากภายนอก [7] และรสชาติปรับเปลี่ยนไปตามวัตถุดิบ

งานวิจัยนี้จึงต้องการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้สอดคล้องกับการแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบท้องถิ่นและสถานการณ์โควิด–19 เนื่องจากทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ต้องการของตลาด เพราะอาหารเสริมไมซีเลียมเห็ดหลินจือในน้ำลำไยนั้นรวมคุณประโยชน์ทางยาจากไมซีเลียมเห็ดหลินจือ และความเป็นเอกลักษณ์ของภาคเหนือจากลำไย ซึ่งปัจจุบันจังหวัดทางภาคเหนือของไทยมีนักท่องเที่ยวชาวไทยและต่างประเทศปีละ 10 ล้านคน ผลิตภัณฑ์ของฝากจากลำไย จึงมีความเป็นไปได้ในการสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบการในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือนั้นมีปัจจัยสำคัญเป็นจำนวนมาก ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน pH และเกลือแร่ [8] ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีวิเคราะห์ทางสถิติหลายขั้นตอนรวมกัน คือ การคัดเลือกตัวแปร การหาช่วงที่เหมาะสม และการหาสภาวะที่เหมาะสม ตามลำดับ [9], [10] เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการขยายกำลังการผลิตกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำลำไยต่อการเจริญเติบโตของไมซีเลียมเห็ดหลินจือเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมไมซีเลียมเห็ดหลินจือ

นำไมซีเลียมเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ที่อยู่บนเพลทอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตัดขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเตรียมจากมันฝรั่งสไลด์กับน้ำกลั่น 200 กรัมต่อลิตร ต้มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใส่น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อถูกเลี้ยงในระยะเวลา 7 วัน ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่า (Shaking Incubator) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้นเม็ดไมซีเลียมเห็ดหลินจือถูกบด และใส่ในสภาวะต่าง ๆ ของการทดลอง

2.2 การหาน้ำหนักแห้งของไมซีเลียมเห็ดหลินจือ

งานวิจัยต้องการนำไมซีเลียมเห็ดหลินจือมาพัฒนาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยที่น้ำหนักแห้งของไมซีเลียมเห็ดหลินจือแสดงถึงผลผลิตไมซีเลียมเห็ดหลินจือ จึงนำไมซีเลียมเห็ดหลินจือที่เจริญเป็นเม็ดเส้นใยในอาหารเหลวมาแยกระหว่างเม็ดเชื้อกับของเหลวใสด้วยกระดาษกรอง เม็ดเชื้อจะถูกอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งของไมซีเลียมเห็ดหลินจือคงที่ ประมาณ 1–2 วัน

2.3 การคัดเลือกตัวแปรต้นโดยวิธี Plackett Burman Design

การคัดเลือกตัวแปรต้นประกอบด้วย ปริมาณน้ำลำไย โดยเตรียมจากนำลำไยอบแห้ง 125 กรัม ต้มในน้ำเดือด 1 ลิตร เป็นเวลาประมาณ 30 นาที วัดความหวานจนได้น้ำลำไยความหวาน 9 องศาบริกซ์ ขึ้นไป จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเนื้อลำไยกับน้ำลำไย นำน้ำกลั่นมาปรับความหวานเพื่อให้ได้น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์, ปริมาณแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายเนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่ราคาถูกหาซื้อได้ทั่วไป, ปริมาณแหล่งไนโตรเจนจากหางนมเนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่สามารถใช้ประกอบอาหาร เกลือแร่ [8] และปริมาณกล้าเชื้อ โดยวิธี Plackett Burman Design ระดับ (Level) ของปัจจัยโดยกำหนดปริมาณตัวแปรต้นที่ระดับต่ำสุด (ค่ารหัส –1) และสูงสุด (ค่ารหัส 1) ดังแสดงตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับสำหรับการคัดเลือกตัวแปรอาหารเลี้ยงเชื้อจากลำไย

ปัจจัย	หน่วย	ระดับ	
		–1	1
น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์	มิลลิลิตรต่อลิตร	100	200
น้ำตาลทราย	กรัมต่อลิตร	5	10
หางนม	กรัมต่อลิตร	5	10
แคลเซียมคาร์บอเนต	กรัมต่อลิตร	0.2	1
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต	กรัมต่อลิตร	0.5	1
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	กรัมต่อลิตร	0.5	1
กล้าเชื้อ	มิลลิลิตรต่อลิตร	25	75

เพื่อศึกษาว่าตัวแปรต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองนั้นมีผลต่อตัวแปรตามเชื้อเห็ดหลินจือมากหรือน้อยโดยพิจารณาจากค่า *p*-value ค่าของ *p*-value ของแต่ละตัวแปรต้นบอกถึงผลกระทบโดยตรงต่อตัวแปรตาม ถ้าค่าของ *p*-value มีค่าน้อยส่งผลต่อตัวแปรตามสูง ดังนั้นการทดลองนี้พิจารณา *p*-value ที่มีค่าน้อยที่สุดก่อน

2.4 การเลือกช่วงที่เหมาะสมโดยวิธี Steepest Ascent

การคัดเลือกตัวแปรที่มีค่า *p*-value น้อยมาหาช่วงที่เหมาะสมเนื่องจากตัวแปรต้นเหล่านี้มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ถ้าเป็นบวก (+) จะต้องเพิ่มปริมาณของตัวแปรนั้น และถ้าค่าสัมประสิทธิ์ถ้าเป็นลบ (–) จะต้องลดปริมาณของตัวแปร ซึ่งสภาวะต่าง ๆ ถูกออกแบบตามวิธีของ Steepest Ascent โดยที่สภาวะที่ได้ค่าตัวแปรตามสูงสุดถูกนำไปออกแบบหาสภาวะที่เหมาะสม

2.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

สภาวะที่ได้ตัวแปรตามสูงสุดถูกนำมาออกแบบการทดลองพื้นผิวตอบสนอง โดยที่ตัวแปรต้นถูกกำหนดเป็น 3 ระดับ ค่าสูงสุด (–1) ค่ากลาง (0) และค่าต่ำสุด (–1) ดังแสดงตารางที่ 2 การออกแบบพื้นผิวตอบสนอง แบบ Full Factorial โดยใช้สมการพหุนามกำลังสอง ดังแสดงสมการที่ (1)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

โดยที่ Y คือ ค่าทำนายการตอบสนอง, β_0 เป็นค่าคงที่, X_1, X_2 เป็นตัวแปรอิสระ, β_1, β_2 เป็นค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น, $\beta 12$ เป็นค่าสัมประสิทธิ์ระหว่างตัวแปร, β_{11}, β_{22} เป็นค่าสัมประสิทธิ์กำลังสอง ซึ่งประสิทธิภาพของการทำนายผลผลิตสูงสุดโดยสมการพหุนามจะพิจารณาจากค่า R^2

ตารางที่ 2 ปัจจัยและระดับสำหรับพื้นผิวตอบสนองตัวแปรอาหารเลี้ยงเชื้อจากลำไย

ปัจจัย		หน่วย	ระดับ		
			–1	0	1
น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์	x_1	มิลลิลิตรต่อลิตร	200	250	300
หางนม	x_2	กรัมต่อลิตร	10	15	20

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือในน้ำลำไย โดยมี 7 ปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการคัดเลือกตัวแปร หาช่วงที่เหมาะสมและหาสภาวะที่เหมาะสม [10]

3.1 การคัดเลือกตัวแปรในการหมักเชื้อเห็ดหลินจือโดยวิธี Plackett Burman Design

ปัจจัยของการหมักไมซีเลียมหลินจือประกอบด้วย น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ ปริมาณ 100–200 มิลลิลิตรต่อลิตร, น้ำตาลทราย 5–10 กรัมต่อลิตร หางนม 5–10 กรัมต่อลิตร, $CaCO_3$ 0.2–1 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.5–1 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5–1 กรัมต่อลิตร และกล้าเชื้อไมซีเลียมหลินจือ 25–75 มิลลิลิตรต่อลิตร นำ 7 ปัจจัย 2 ระดับ มาออกแบบการทดลอง 8 สภาวะโดยวิธี Plackett Burman Design การออกแบบการทดลองและผลน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือดังแสดงในตารางที่ 3 นำข้อมูลของตัวแปรต้น 7 ปัจจัย ที่การทดลอง 8 สภาวะ กับตัวแปรตามจากผลน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือมาวิเคราะห์ความถดถอย

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์ความถดถอยและวิเคราะห์สหสัมพันธ์ที่ได้จากการทดลองระหว่าง 7 ปัจจัยต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือตามพบว่า การทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ (Significance F < 0.05) และปัจจัยปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ กับหางนมมีอิทธิพลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ โดยพิจารณาจาก p-value < 0.05 ส่งผลให้ค่าระดับความเชื่อมั่น (Confident Level) มากกว่า 95% เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficients) ที่เป็นบวกพบว่า ถ้าเพิ่มปริมาณน้ำลำไย

ตารางที่ 3 Plackett Burman Design สำหรับคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์	น้ำตาลทราย	หางนม	แคลเซียมคาร์บอเนต	โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต	แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	กล้าเชื้อ	น้ำหนักแห้ง
ml/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	ml/L	g/L
x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	Y
200	5	5	1	0.5	1	75	8.05 ± 1.48
200	10	5	0.2	1	0.5	75	7.5 ± 0.85
200	10	10	0.2	0.5	1	25	10.85 ± 0.64
100	10	10	1	0.5	0.5	75	9.25 ± 0.07
200	5	10	1	1	0.5	25	10.85 ± 0.21
100	10	5	1	1	1	25	6.25 ± 0.49
100	5	10	0.2	1	1	75	9.15 ± 1.91
100	5	5	0.2	0.5	0.5	25	4.3 ± 0.71

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ Plackett Burman Design สำหรับคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

ปัจจัย	หน่วย	จุดตัดแกนตั้ง	ค่าสัมประสิทธิ์	ค่า *p*	ระดับความเชื่อมั่น
			0.828	**0.000**	**100**
น้ำลำไย 9 องศาบริกซ์	ml/L	x_1	0.104	0.003*	99.705
น้ำตาลทราย	g/L	x_2	0.019	0.468	53.152
หางนม	g/L	x_3	0.175	0.000*	99.990
แคลเซียมคาร์บอเนต	g/L	x_4	0.033	0.224	77.636
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต	g/L	x_5	0.016	0.528	47.193
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	g/L	X_6	0.030	0.258	74.194
กล้าเชื้อ	ml/L	X_7	0.021	0.414	58.648

ตารางที่ 5 การออกแบบการทดลองและผลการทดลองวิธี Steepest Ascent สำหรับปัจจัยที่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

ขั้นตอนการไต่ระดับ	x_1	x_2	X_1 ml/L	X_2 g/L	น้ำหนักแห้ง g/L
การไต่ระดับ (Δ)	0.593	1	29.643	2.5	8.200 ± 0.990
ตำแหน่งกึ่งกลาง	0	0	150.000	7.5	
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 1Δ	0.593	1	179.643	10	10.450 ± 0.919
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 2Δ	1.186	2	209.286	12.5	10.650 ± 1.061
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 3Δ	1.779	3	238.929	15	15.450 ± 2.333
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 4Δ	2.371	4	268.571	17.5	16.950 ± 1.344
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 5Δ	2.964	5	298.214	20	8.500 ± 0.849
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 6Δ	3.557	6	327.857	22.5	10.700 ± 1.131
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 7Δ	4.150	7	357.500	25	9.600 ± 0.707
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 8Δ	4.743	8	387.143	27.5	8.050 ± 2.475
ตำแหน่งกึ่งกลาง + 9Δ	5.336	9	416.786	30	10.950 ± 2.192

9 องศาบริกซ์ กับหางนมจะมีผลทำให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากน้ำลำไยเป็นแหล่งคาร์บอนของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคสและซูโครส ที่จุลินทีย์ใช้ในเจริญเติบโต [11] โดยส่วนประกอบหลักที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นไมซีเลียมหลินจือสามารถดูดซึมใช้ได้ง่ายกว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ นอกจากนี้เนื้อลำไยยังมีส่วนประกอบทางโภชนาการที่ส่งเสริมการเจริญเติบโต ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย ไขมัน วิตามินซี กรดอะมิโน และแร่ธาตุ [12] ทางด้านหางนมนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนและมีน้ำตาลแลคโตสในปริมาณมากที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใยไมซีเลียมของหลินจือ [13] ดังนั้นปัจจัยทั้งสองจึงเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักแห้งของไมซีเลียมของหลินจือ

3.2 การเลือกช่วงที่เหมาะสมในการหมักเชื้อเห็ดหลินจือโดยวิธี Steepest Ascent

จากตารางที่ 4 ผลของ Plackett Burman Design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญพบว่า ปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ กับหางนมจะมีผลทำให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือเพิ่มขึ้น จึงนำค่าสัมประสิทธิ์มาศึกษาหาช่วงที่เหมาะสมในการหมักเชื้อเห็ดหลินจือโดยวิธี Steepest Ascent ทั้งตัวแปรอื่นใช้ค่าที่

ระดับกลางประกอบด้วย น้ำตาล 7.5 กรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 0.6 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.75 กรัมต่อลิตร เชื้อไมซีเลียมหลินจือ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร การทดลองโดยค่ากลางของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 150 มิลลิลิตรต่อลิตร เพิ่มขึ้นครั้งละ 29.643 มิลลิลิตรต่อลิตร และค่ากลางของหางนม 7.5 กรัมต่อลิตรเพิ่มขึ้นครั้งละ 2.5 กรัมต่อลิตร การออกแบบการทดลองและผลแสดงตารางที่ 5 โดยที่ x_1 เป็นค่ารหัสกับ X_1 เป็นค่าจริงของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และ x_2 เป็นค่ารหัสกับ X_2 เป็นค่าจริงของหางนม

จากตารางที่ 5 ผลการทดลองของวิธี Steepest Ascent พบว่า ที่ตำแหน่งกึ่งกลาง + 4Δ (การไต่ระดับ 4 เท่า) แสดงผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ 16.950 ± 1.344 กรัมต่อลิตร โดยที่ค่าปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 268.571 มิลลิลิตรต่อลิตร และปริมาณหางนม 17.5 กรัมต่อลิตร ดังนั้นช่วงที่เหมาะสมของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 200–300 มิลลิลิตรต่อลิตร และปริมาณหางนม 10–20 กรัมต่อลิตร

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเชื้อเห็ดหลินจือโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

เมื่อได้ช่วงที่เหมาะสมของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 200–300 มิลลิลิตรต่อลิตร และปริมาณหางนม 10–20 กรัมต่อลิตร นำมาออกแบบการทดลอง Full Factorial ที่ 9 สภาวะ การออกแบบการทดลองและผลแสดงตารางที่ 6 ซึ่งปัจจัยอื่น ๆ ค่าระดับกลางประกอบด้วย น้ำตาล 7.5 กรัมต่อลิตร, $CaCO_3$ 0.6 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 0.75 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.75 กรัมต่อลิตร และเชื้อไมซีเลียมหลินจือ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร

เมื่อได้ผลการทดลองอิทธิพลของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และปริมาณหางนมต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของพื้นผิวตอบสนอง ดังแสดงตารางที่ 7 พบว่า การทดลองมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญ (Significance F < 0.05) และมีค่า Multiple R, R Square Adjusted และ R Square มากกว่า 95 แสดงว่าค่าสัมประสิทธิ์

ตารางที่ 6 การออกแบบการทดลองและผลการทดลองพื้นผิวตอบสนองปัจจัยที่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

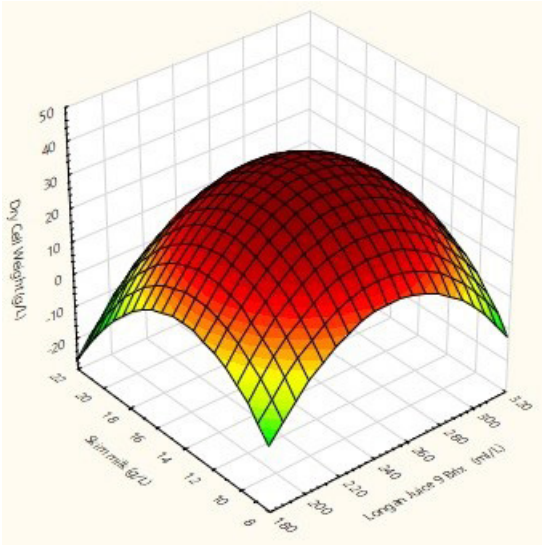
การทดลอง	x_1	x_2	X_1	X_2	น้ำหนักแห้ง (g/L)	
			ml/L	g/L	ค่าจากการทดลอง	ค่าจากการทำนาย
1	–1	–1	200	10	14.5	13.797
2	–1	0	200	15	20.3	21.689
3	–1	1	200	20	3	2.314
4	0	–1	250	10	25.8	26.922
5	0	0	250	15	38.5	36.289
6	0	1	250	20	17.3	18.389
7	1	–1	300	10	13.4	12.981
8	1	0	300	15	23	23.822
9	1	1	300	20	7.8	7.397

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนพื้นผิวตอบสนองของปัจจัยที่ส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

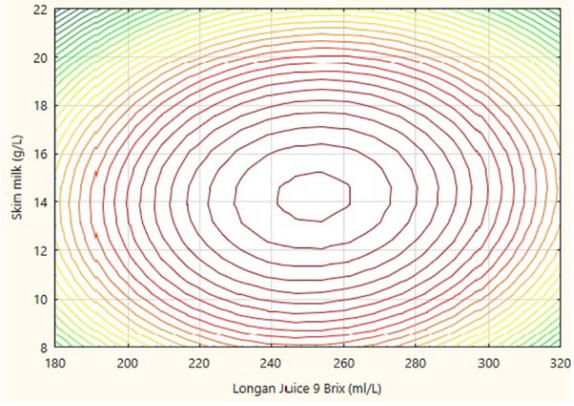
	ค่าสัมประสิทธิ์	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่า p	ระดับความเชื่อมั่น
จุดตัดแกนตั้ง	36.289	1.443	0.000	99.986
x_1	1.067	0.790	0.270	73.008
x_2	–4.267	0.790	0.012	98.754
x_1x_2	1.475	0.968	0.225	77.508
x_1^2	–13.533	1.369	0.002	99.780
x_2^2	–13.633	1.369	0.002	99.785

Multiple R = 0.994, R Square = 0.987, Adjusted R Square = 0.966, Significance F =0.005

จากตารางที่ 7 สามารถนำมาสร้างสมการเพื่อทำนายอิทธิพลของปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ (x_1) และปริมาณหางนม (x_2) ต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ (y) ดังแสดงสมการที่ (2) เมื่อพิจารณาจากค่า p-value < 0.05 และค่าสัมประสิทธิ์ พบว่า ปริมาณหางนม (x_2) ลดลงส่งผลต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือเพิ่มขึ้น และปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ (x_1^2) และปริมาณหางนม (x_2^2) รูปแบบกำลังสองแสดงว่าค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่กำหนดไว้



รูปที่ 1 3 มิติ ของปัจจัยปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และปริมาณหางนมต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ



รูปที่ 2 ระดับพื้นผิวของปัจจัยปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และปริมาณหางนมต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ

$$Y = 36.289 + 1.067X_1 - 4.267X_2 + 1.475X_1X_2 - 13.533X_1^2 - 13.633X_2^2 \quad (2)$$

นำสมการที่ (2) มาสร้างภาพ 3 มิติและระดับพื้นผิวของปัจจัยปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และปริมาณหางนมต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือ ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2

จากรูปที่ 1 และ 2 แสดงอิทธิพลของปัจจัยปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ และปริมาณหางนมต่อน้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือโดยแสดงปริมาณน้ำหนักแห้งมากสุดจนต่ำสุดตามลำดับสี คือ แดง ส้ม เหลือง และเขียว พบว่า ปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ เพิ่ม 200–250 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งผลให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่ม 250–300 มิลลิลิตรต่อลิตร กลับทำให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือลดลง และปริมาณหางนมเพิ่ม 10–15 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณหางนม 15–30 กรัมต่อลิตร กลับทำให้น้ำหนักแห้งไมซีเลียมหลินจือลดลง เนื่องจากได้รับแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปทำให้เกิดแรงดันระหว่างสารละลาย โดยถ้านำกล้าเชื้อไมซีเลียมหลินจือใส่ลงในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าภายในเซลล์ จะเกิดแรงดันออสโมติกดึงของเหลวออกนอกเซลล์ส่งผลการเจริญเติบโตของไมซีเลียมหลินจือลดลง [14]

เมื่อนำสมการที่ (2) มาคำนวณเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวัตถุประสงค์ต้องการผลผลิตไมซีเลียมหลินจือน้ำหนักแห้งสูงสุด ซึ่งข้อกำหนดปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์อยู่ระหว่าง 200–300 มิลลิลิตรต่อลิตร และปริมาณหางนมอยู่ระหว่าง 10–20 กรัมต่อลิตร พบว่า สภาวะปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 251.549 มิลลิลิตรต่อลิตร ปริมาณหางนม 14.226 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไมซีเลียมหลินจือน้ำหนักแห้ง 36.636 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาในการผลิตไมซีเลียมหลินจือน้ำหนักแห้ง [15] 22.62 กรัมต่อลิตร [16] 23.79 กรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้เป็นอีกแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับลำไยที่มีอัตลักษณ์ของภาคเหนือแต่ราคาตกต่ำ ไม่สามารถส่งออก โดยกระบวนการหมักเห็ดราทางยาเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการใช้นวัตกรรมเพื่อช่วยเหลือเกษตรกรชาวสวนลำไย และยังสามารถประยุกต์ใช้กับวัตถุดิบเกษตรอื่น ๆ เช่น ข้าว ข้าวเหนียว ข้าวโพด อ้อย มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง นม ผลไม้ต่าง ๆ โดยขั้นตอนการวิเคราะห์เพื่อสภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อไปการขยายกำลังการผลิตในถังหมักขนาดใหญ่เพื่อพัฒนานวัตกรรมอาหารและยาเพื่อสุขภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไป แต่อย่างไรก็ตามอุปกรณ์และเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีราคาสูง อุปกรณ์บางอย่างต้อง

นำเข้าจากต่างประเทศ การพัฒนาอุปกรณ์และเครื่องมือด้านการหมักตลอดจนการนำเข้าควรได้รับการสนับสนุนจากทุกภาคส่วน เพราะเทคโนโลยีชีวภาพนั้นสามารถเปลี่ยนวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศที่มีมากมาย ราคาถูกและล้นตลาดเป็นอาหารและยาที่มีมูลค่าสูง สอดคล้องกับนโยบายรัฐบาลที่พยายามผลักดันระบบเศรษฐกิจอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารแบบใหม่ที่พึ่งพาความรู้ และเทคโนโลยีใหม่ ๆ จากงานวิจัยและนวัตกรรมของสถาบันการศึกษา

4. สรุป

ในสถานการณ์โควิด-19 ได้นำสมุนไพรมาแปรรูปเพื่อใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน การแปรรูปโดยวิธีหมักเห็ดราทางยาจากวัตถุดิบท้องถิ่นจึงมีความสำคัญในการเพิ่มมูลค่าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้ตรงกับความต้องการงานวิจัยนี้จึงศึกษากระบวนการหมักไมซีเลียมเห็ดหลินจือจากลำไย โดยอิทธิพลของสูตรอาหารส่งผลต่อผลผลิตไมซีเลียมหลินจือในน้ำลำไยประกอบด้วยน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ ปริมาณ น้ำตาลทราย หางนม $CaCO_3$ KH_2PO_4 $MgSO_4.7H_2O$ และ ปริมาณเชื้อไมซีเลียมหลินจือ ในการศึกษานี้ได้นำ 7 ปัจจัยมาคัดเลือกตัวแปร หาช่วงที่เหมาะสม และพื้นผิวตอบสนองมาออกแบบการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สภาวะที่เหมาะสม ปริมาณน้ำลำไย 9 องศาบริกซ์ 251.549 มิลลิลิตรต่อลิตร ปริมาณหางนม 14.226 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทราย 7.5 กรัมต่อลิตร $CaCO_3$ 0.6 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.75 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.75 กรัมต่อลิตร กล้าเชื้อไมซีเลียมหลินจือ 50 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะนี้สามารถผลิตไมซีเลียมหลินจือน้ำหนักแห้งสูงสุด 36.636 กรัมต่อลิตร งานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์กับวัตถุดิบทางการเกษตรอื่น ๆ ที่มีราคาตกต่ำให้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและยาจากกระบวนการหมักที่มีมูลค่าสูง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (กสว) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

เอกสารอ้างอิง

[1] T. Gan, C. Feng, H. Lan, R. Yang, J. Zhang, C. Li, and W. Li, “Comparison of the structure and immunomodulatory activity of polysaccharides from fresh and dried longan,” *Journal of Functional Foods*, vol. 76, Art. no. 104323, 2021.

[2] C. Somjai, T. Siriwoharn, K. Kulprachakarn, S. Chaipoot, R. Phongphisutthinant, W. Chaiyana, S. Srinuanpan, and P. Wiriyacharee, “Effect of drying process and long-term storage on characterization of Longan pulps and their biological aspects: Antioxidant and cholinesterase inhibition activities,” *LWT-Food Science and Technology*, vol. 154, Art. no. 112692, 2022.

[3] Y. H. Tseng, J. H. Yang, and J. L. Mau, “Antioxidant properties of polysaccharides from Ganoderma tsugae,” *Food Chemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 732–738, 2008.

[4] X. B. Mao, T. Eksriwong, S. Chauvatcharin and, J. J. Zhong, “Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom Cordyceps militaris,” *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 5, pp. 1667–1672, 2005.

[5] K. I. Lin, Y. Y. Kao, H. K. Kuo, W. B. Yang, A. Chou, H. H. Lin, A. L. Yu, and C. H. Wong, “Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2-mediated induction of transcription factor blimp-1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 34, pp. 24111–24123, 2006.

[6] K. Arunachalam, S. P. Sasidharan, and X. Yang,

"A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19," *Food Chemistry Advances*, vol. 1, Art. no. 100023, 2022.

[7] J. P. Balamurugan, S. Supramani, S. R. A. Usuldin, Z. Ilham, A. Klaus, N. K. K. Ikram, R. Ahmad, and W. A. A. Q. I. Wan-Mohtar, "Efficient biomass-endopolysaccharide production from an identified wild-Serbian Ganoderma applanatum strain BGS6Ap mycelium in a controlled submerged fermentation," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 37, Art. no. 102166, 2021.

[8] N. A. Hassan, S. Supramani, M. N. A. Sohedein, S. R. A. Usuldin, A. Klaus, Z. Ilham, W. H. Chen, and W. A. A. Q. I. Wan-Mohtar, "Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-Serbian Ganoderma lucidum strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 21, Art. no. 101305, 2019.

[9] S. Jinendiran, D. Kumar, H. U. Dahms, C. D. Arulanandam, and N. Sivakumar, "Optimization of submerged fermentation process for improved production of β-carotene by Exiguobacterium acetylicum S01," *Heliyon*, vol. 5, no. 5, Art. no. e01730, 2019.

[10] N. Narkprasom, J. H. Guo, T. C. Huang, and Y. K. Guu, "Combination of statistical techniques for submerged fermentation for extracellular polysaccharide and biomass of *Ganoderma tsugae*," *American Journal of Biostatistics*, vol. 3, no. 2, pp. 38–46, 2013.

[11] T. Luo, L. Shua, T. Lai, L. Liao, J. Li, Z. Duan, X. Xue, D. Han, and Z. Wu, "Up-regulated glycolysis, TCA, fermentation and energy metabolism promoted the sugar receding in 'Shixia' longan (*Dimocarpus longan* Lour.) pulp," *Scientia Horticulturae*, vol. 281, Art. no. 109998, 2021.

[12] X. F. Zhang, S. Guo, C. T. Ho, and N. S. Bai, "Phytochemical constituents and biological activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit: A review," *Food Science and Human Wellness*, vol. 9, no. 2, pp. 95–102, 2020.

[13] M. Y. Chang, G. J. Tsai, and J. Y. Houng, "Optimization of the medium composition for the submerged culture of Ganoderma lucidum by Taguchi array design and steepest ascent method," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, no. 3–4, pp. 407–414, 2006.

[14] M. l. Cui, H. Y. Yang and G. Q. He, "Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS," *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, no. 16, pp. 998–1010, 2015.

[15] Y. J. Tang, . W. Zhang, R. S. Liu, L. W. Zhu, and J. J. Zhong, "Scale-up study on the fed-batch fermentation of Ganoderma lucidum for the hyperproduction of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides," *Process Biochemistry*, vol. 46, no. 1, pp. 404–408, 2011.

[16] J. Zhang, J. J. Zhong, and A. Geng, "Improvement of ganoderic acid production by fermentation of Ganoderma lucidum with cellulase as an elicitor," *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 10, pp. 1580–1586, 2014.