

การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยคลื่นไมโครเวฟ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกลและระบบกระบวนการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2561

**EXTRACTION OF BETA GLUCAN FROM *PLEUROTUS*
SAJOR-CAJU (FR.) SING USING
MICROWAVE EXTRACTION**

Pornpimol Moolkaew

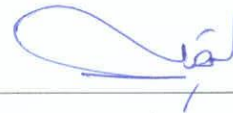


**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Engineering in Mechanical and
Process System Engineering
Suranaree University of Technology
Academic Year 2018**

การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยคลื่นไมโครเวฟ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร.สุกิตต์ สายสุนทร)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.ธีราพร จุลยเสน)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(ผศ. ดร.เทวรัตน์ ตีร์อำรรค)

กรรมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(ศ. ดร.สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล



(รศ. ร.อ. ดร.กนต์ธร ชำนิประศาสน์)

คณบดีสำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์

พรพิมล มุลแก้ว : การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยคลื่นไมโครเวฟ
(EXTRACTION OF BETA-GLUCAN FROM *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* (FR.)
SING USING MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION) อาจารย์ที่ปรึกษา :
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีราพร จุลยุเสน, 98 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (MAE) ของเห็ดนางฟ้าภูฐานที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min ต่อปริมาณสารตกตะกอน (MAE-precipitate) และปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบปริมาณสารตกตะกอน (AE-precipitate) ที่ได้จากการสกัดด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) ที่อุณหภูมิ 80, 100, และ 120°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min จากผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วย MAE มีผลทำให้ได้ปริมาณ precipitate สูงกว่าการสกัดด้วย AE อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณ MAE-precipitate และอุณหภูมิในการสกัดมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก ในขณะที่ระยะเวลาการสกัดไม่มีผลต่อปริมาณ MAE-precipitate อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant property) ของ MAE-precipitate เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณสารเบต้ากลูแคน (β -glucan) ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงกว่า 100°C นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ MAE-precipitates ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) และเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FTIR) ยืนยันว่า MAE-precipitates มี (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -glucan เป็นส่วนประกอบ สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด MAE-precipitate และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี MAE จากเห็ดนางฟ้าภูฐานคือ การสกัดด้วยอุณหภูมิสูงที่ 140°C เป็นเวลา 5 min

สาขาวิชา วิศวกรรมเกษตร
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา พรพิมล มุลแก้ว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Dr. T.

PORNPIMOL MOOLKAEW: EXTRACTION OF BETA-GLUCAN
FROM *PLEUROTUS SAJOR-CAJU* (FR.) SING USING MICROWAVE-
ASSISTED EXTRACTION : ASST. PROF. TIRAPORN JUNYUSEN, Ph.D.,
98 PP.

EDIBLE MUSHROOM/*PLEUROTUS SAJOR-CAJU* POLYSACCHARIDES/
MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION/BIOACTIVE COMPOUNDS

The objectives of this study were to investigate the effect of microwave-assisted extraction (MAE) of *Pleurotus sajor-caju*, under variable MAE temperatures (80, 100, 120, and 140°C) and irradiation times (5, 10, and 15 min), on the precipitate yields and bioactive compound contents. For comparison purposes, autoclave extraction (without microwave) was carried out under variable extraction temperatures and times. Additionally, the physical characteristics of MAE-precipitates were characterized. The results showed that MAE-precipitate yields and extraction temperatures were positively correlated, whereas prolonged irradiation time had no impact on the MAE-precipitate yield. Total phenolics and the antioxidant activities of MAE-precipitates were significantly increased with increase in MAE temperatures, while β -glucan content was insignificantly different beyond 100°C. The optimal MAE condition of *P. sajor-caju* was thus that of elevated extraction temperatures 140°C and 5-min irradiation time. Moreover, the MAE-precipitates contained (1→3, 1→6)- β -glucan.

School of Agricultural Engineering

Academic Year 2018

Student's Signature พณิพัล มลแก้ว

Advisor's Signature Dr. T.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธิดาพร จุลยุเสนา อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้ ให้การอบรมสั่งสอน คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะวิธีการศึกษาในทุกขั้นตอนเป็นอย่างดีจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พยุงศักดิ์ จุลยุเสนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภกิตต์ สายสุนทร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวรัตน์ ตรีอำนาจ กรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการแก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะครูอาจารย์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และความสามารถแก่ผู้วิจัย คอยดูแล ให้คำปรึกษา และให้กำลังใจตลอดการศึกษาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มอบทุนการศึกษา “กิตติบัณฑิต” ตลอดระยะเวลาในระหว่างการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเพื่อนพี่น้องสาขาวิศวกรรมเกษตรทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ร่วมทุกข์ร่วมสุข และให้ความช่วยเหลือเมื่อเกิดอุปสรรค

ท้ายนี้คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ อันเกิดจากปัญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดามารดา ครอบครัว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยอย่างดีมาตลอด

พรพิมล มุลแก้ว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรัชมนวัตกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เห็ด.....	4
2.1.1 การจำแนกประเภทของเห็ด.....	4
2.1.2 ส่วนประกอบของดอกเห็ด.....	5
2.1.3 โครงสร้างทางเคมีของเห็ด.....	7
2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ด.....	7
2.1.5 เห็ดนางฟ้าภูฐาน.....	10
2.2 เบต้ากลูแคน.....	12
2.2.1 เบต้ากลูแคนคืออะไร.....	12
2.2.2 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน.....	13
2.2.3 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเบต้ากลูแคนในเห็ด.....	14
2.3 วิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ.....	16
2.3.1 หลักการของการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า	
2.3.2	ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดสารด้วยคลื่นไมโครเวฟ.....	19
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	21
3	วิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
3.1	ผลของระยะเวลาการสกัดหีดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	28
3.1.1	วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ.....	28
3.1.2	การสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ.....	28
3.1.3	การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ.....	29
3.1.4	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	32
3.1.5	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค.....	34
3.2	ผลของอุณหภูมิการสกัดหีดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	34
3.2.1	การเตรียมวัตถุดิบ.....	35
3.2.2	การสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ.....	35
3.2.3	การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ.....	35
3.2.4	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	36
3.2.5	การวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้ากลูแคน.....	37
3.2.6	การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	40
3.2.7	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค.....	42
3.2.8	การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของสาร โดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด.....	43
3.2.9	การวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์.....	43
3.2.10	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	44
3.3	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	45
3.3.1	การวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อผลของระยะเวลาการสกัดหีด ต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	45

สารบัญ (ต่อ)

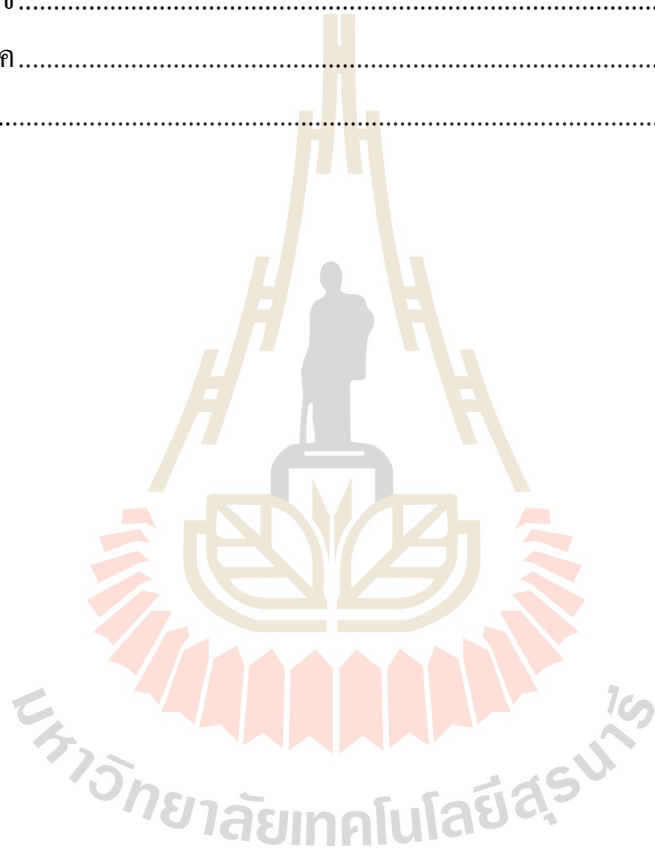
หน้า

3.3.2	การวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อผลของอุณหภูมิการสกัดแห้งต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	46
4	ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ผล	47
4.1	ผลของระยะเวลาการสกัดแห้งต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์.....	47
4.1.1	ผลของวิธีการสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำและคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณส่วนตกค้างและตกตะกอน	47
4.1.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	48
4.1.3	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค	51
4.2	ผลของอุณหภูมิการสกัดแห้งต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์	53
4.2.1	ผลของวิธีการสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำและคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณส่วนตกค้างและตกตะกอน	53
4.2.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	58
4.2.3	ผลของวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณสารเบต้ากลูแคน.....	60
4.2.4	ผลของวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	61
4.2.5	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค	64
4.2.6	การวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของส่วนตกตะกอนโดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด	66
4.2.7	การวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์	68
4.2.8	การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของส่วนตกตะกอนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	69
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	72
5.1	สรุปผลการทดลอง	72
5.2	ข้อเสนอแนะ	73
	รายการอ้างอิง.....	74

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	83
ภาคผนวก ข.....	89
ภาคผนวก ค.....	95
ประวัติผู้เขียน.....	98

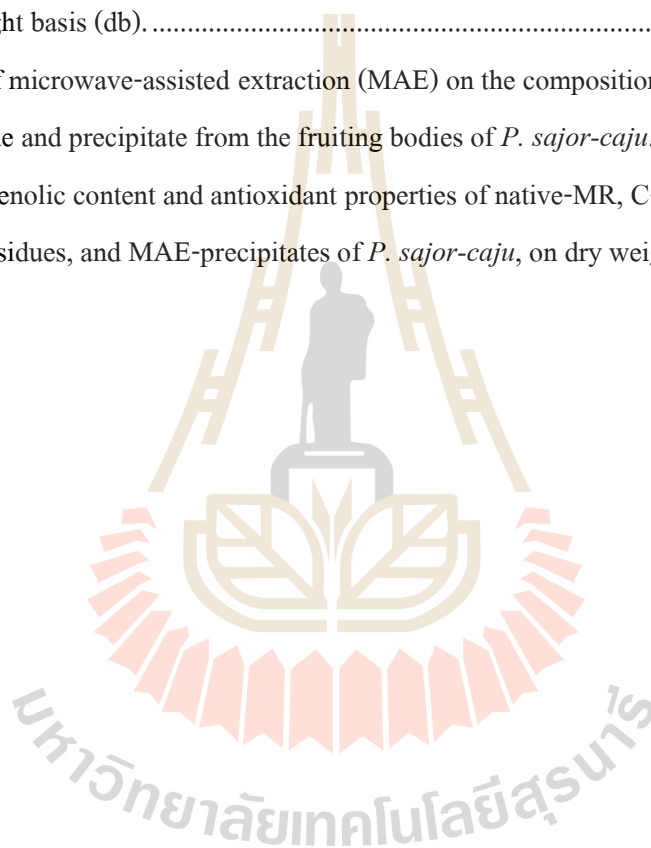


สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ดัชนีของกรดอะมิโนจำเป็นและกรดไขมันทางโภชนาการของเห็ด เปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์ต่าง ๆ 8
2.2	กรดอะมิโนจำเป็นของเห็ดกินได้ 9
2.3	องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดส่วนที่กินได้ 100 g 11
2.4	ลักษณะโครงสร้างอย่างง่ายของเบต้ากลูแคนจากแหล่งที่มาชนิดต่าง ๆ 14
2.5	แสดงค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในวิธี MAE 20
4.1	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 120°C on residue yields and precipitate yields of <i>P. sajor-caju</i> with different time. 48
4.2	Nutritional composition of <i>P. sajor-caju</i> fruiting bodies (native-MR) expressed in dry weight basis (db). 49
4.3	The chemical composition of AE- residues and MAE- residues of <i>P. sajor-caju</i> on dry weight basis (db). 50
4.4	The chemical composition of AE-precipitates and MAE-precipitates of <i>P. sajor-caju</i> on dry weight basis (db). 50
4.5A	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 5 min on residue yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature. 55
4.5B	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 10 min on residue yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature. 55
4.5C	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 15 min on residue yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature. 56
4.6A	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 5 min on precipitate yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature. 56
4.6B	Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 10 min on precipitate yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature. 67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.6C Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 15 min on precipitate yields of <i>P. sajor-caju</i> with different temperature.	57
4.7 Nutritional composition of <i>P. sajor-caju</i> fruiting bodies (native-MR) expressed in dry weight basis (db).	58
4.8 Effect of microwave-assisted extraction (MAE) on the composition of residue and precipitate from the fruiting bodies of <i>P. sajor-caju</i>	59
4.9 Total phenolic content and antioxidant properties of native-MR, C- β -glucan, MAE-residues, and MAE-precipitates of <i>P. sajor-caju</i> , on dry weight basis.	63



สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	เห็นชนิดต่าง..... 5
2.2	โครงสร้างส่วนประกอบของเห็ด..... 6
2.3	โครงสร้างทางเคมีของเห็ดประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น..... 7
2.4	วงจรชีวิตของเห็ดนางฟ้า..... 12
2.5	โครงสร้างของเบต้ากลูแคนชนิด (1→3, 1→6)-β-glucan..... 13
2.6	สเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า..... 18
2.7	โมเลกุลของตัวทำละลายที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทาง ของสนามไฟฟ้า..... 18
2.8	β-Glucan content (g/100 g DM) of various fractions of mushroom by- product powder..... 25
2.9	The response surface plots of the effect of extraction time and water to raw material ratio and their reciprocal interaction on polysaccharide yield (%). 26
2.10	Main effects diagram for the extraction yield of β-glucans from <i>Ganoderma lucidum</i> 27
3.1	ขั้นตอนการเตรียมผงเห็ด (native-MR)..... 29
3.2	เครื่องที่ใช้ในการสกัดเบต้ากลูแคน..... 30
3.3	ผังการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) หรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) จากเห็ดนางฟ้าฐานที่อุณหภูมิ 120°C เวลา 15-45 min..... 31
3.4	เครื่องที่ใช้วิเคราะห์ห้องค้ประกอบทางเคมี..... 33
3.5	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด..... 34
3.6	การตกตะกอน (precipitation) ของพอลิแซ็กคาไรด์ หลังเติมเอทานอล 95% ลงในสารสกัด (3:1; v/v)..... 36
3.7	ผังการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) หรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) จากเห็ดนางฟ้าฐานที่อุณหภูมิ 80-120°C เวลา 5-15 min..... 37
3.8	เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ..... 41
3.9	เครื่อง UV-spectrophotometer และเครื่อง microplate spectrophotometer..... 42

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.10 วิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	43
3.11 เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์	44
3.12 เครื่องวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์	44
3.13 กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม	45
4.1 SEM images (1200x) of: (A) native-MR; (B, C, and D) AE-R15, -R30, and -R45, respectively; (E, F, and G) MAE-R15, -R30, and -R45, respectively	52
4.2 β -glucan and α -glucan content of native-MR, C- β -glucan, MAE-residues, and MAE-precipitates of <i>P. sajor-caju</i>	61
4.3 The SEM images of: (A) Native-MR; (B) AE-R120; (C) MAE-R80; (D) MAE-R100; (E) MAE-R120; and (F) MAE-R140. The magnification is 1,200x.....	65
4.4 The SEM images of : (A) C- β -glucan; (B) AE-P120 ; (C) MAE-P80; (D) MAE-P100; (E) MAE-P120; and (F) MAE-P140. The magnification is 1,200x.	66
4.5 FTIR spectra of the 4000 - 400 cm ⁻¹ region of (A) native-MR, (B) C- β -glucan, (C) MAE-P80, (D) MAE-P100, (E) MAE-P120, and (F) MAE-P140.	68
4.6 ¹³ C NMR spectra of: (A) MAE-P80, (B) MAE-P100, (C) MAE-P120, (D) MAE-P140	69
4.7 AFM images of: (A) native-MR, (B) MAE-P80, (C) MAE-P100, (D) MAE-P120, (E) MAE-P140, where I and II represent AMF planar and three-dimensional images, respectively.	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญจากธรรมชาติ เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม “ฟังไจ” (Fungi) หรือเรียกว่ากลุ่ม “เห็ด-รา” ซึ่งเห็ดแตกต่างจากราตรงที่จะมีเส้นใยที่สามารถถักทอรวมกันเป็นจนเกิดเป็นดอกเห็ดได้ เห็ดบนโลกใบนี้มีจำนวนหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกประเภทของเห็ดได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ใช้เป็นอาหาร (เช่น เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดเข็มทอง) เห็ดกลุ่มทางการแพทย์ที่สามารถออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (เช่น เห็ดหลินจือ เห็ดถั่งเช่า) และกลุ่มเห็ดที่มีพิษ ซึ่งไม่สามารถรับประทานได้ (เช่น เห็ดระโงกหิน เห็ดหิ่งห้อย) มนุษย์ทั่วโลกรู้จักและนำเห็ดมาใช้ในการประกอบอาหารเป็นเวลานานแล้ว เนื่องจากเห็ดมีรสชาติที่ดีและมีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ปัจจุบันคนไทยนิยมบริโภคเห็ดมากขึ้น ส่งผลให้ตลาดและธุรกิจเห็ดขยายตัวเติบโตอย่างต่อเนื่อง สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) เปิดเผยว่าในปี 2558 ไทยมีปริมาณผลผลิตเห็ดสูงถึง 15,000 ตัน มีมูลค่ารวมกว่า 1,156 ล้านบาท คนไทยบริโภคเห็ดเฉลี่ย 10 กิโลกรัมต่อคนต่อปี (ประชากรชาติธุรกิจ, 2555:ออนไลน์) โดยเฉพาะเห็ดนางฟ้าภูฐานซึ่งเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี และอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ เป็นแหล่งวิตามินและเกลือแร่ มีโปรตีนสูง มีไขมันน้อย ให้พลังงาน (Calorie) ต่ำ และยังเป็นแหล่งของใยอาหารที่ดีอีกด้วย (Carbonero et al., 2012; Satitimanwivat et al., 2012; Jantaramanant, Sermwittayawong, Noipha, Hutadilok-Towatana, & Wititsuwannakul, 2014; Finimundy et al., 2018) จึงเป็นอาหารที่มีผลดีต่อสุขภาพ และช่วยควบคุมน้ำหนักได้ นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะพอลิแซ็กคาไรด์ (เบต้ากลูแคน) ซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งอาหารเสริมสุขภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมาก (Finimundy et al., 2018; Carbonero et al., 2012; Satitimanwivat et al., 2012)

พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดมีกลูแคนเป็นส่วนประกอบหลัก เกิดจากน้ำตาลกลูโคสจำนวนหลายโมเลกุลมาเรียงตัวกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ มีทั้งสายตรงและสายแขนง ชนิดกลูแคนของเห็ดที่พบมากที่สุดคือ (1 → 3,1 → 6)-β-D-glucan เบต้ากลูแคน (β-glucan) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพมากที่สุด พบในผนังเซลล์ของยีสต์ เห็ด รา ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ และแบคทีเรียบางชนิด จึงทำให้เบต้ากลูแคนแต่ละแหล่งที่มา มีโครงสร้างที่ต่างกันออกไป รวมถึงน้ำหนักโมเลกุล ความยาวของสายพอลิเมอร์ ระดับการแตกแขนงของกิ่ง (Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015) นักวิจัยหลายท่านได้รวบรวมและรายงานประโยชน์ของเบต้ากลูแคน เนื่องจากเบต้ากลูแคนทำงานร่วมกับเซลล์

แมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่แข็งแรงที่สุดในร่างกายจะทำงานได้ดีและมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อรวมตัวกับเบต้ากลูแคน ช่วยในการป้องกันยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Cha et al., 2012) ช่วยกระตุ้นวงจรการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ให้ทำหน้าที่ทำลายเซลล์แปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย รวมถึงพวกไวรัสและแบคทีเรียได้อีกด้วย (Moradali, Mostafavi, Ghods, & Hedjaroude, 2007) นอกจากนี้เบต้ากลูแคนจากเห็ดยังสามารถช่วยปรับสภาพอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น ระดับความดันโลหิต (Goff et al., 2007) ระดับน้ำตาลในเลือด (Chen & Raymond, 2008) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (Deng et al., 2012) จากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ดังกล่าว จึงทำให้มีการนำสารเบต้ากลูแคนมาใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก เช่น ผสมในเครื่องดื่มและอาหาร ยาจากธรรมชาติ พัฒนาเป็นอาหารเสริม และเครื่องสำอาง

เบต้ากลูแคนจากเห็ดสามารถสกัดได้จากส่วนบริเวณฟรุตบอดี (Fruit bodies) และไมซีเลียม (Mycelium) มีการศึกษาวิธีการสกัดเบต้ากลูแคนอย่างกว้างขวาง วิธีการสกัดแบบทั่วไป โดยใช้น้ำร้อนหรือคาง อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ต้องใช้ตัวทำละลายมาก ใช้เวลาในการสกัดนานและได้ปริมาณสารสกัดต่ำ (Santos-Neves et al., 2008; Carbonero et al., 2012; Smiderle et al., 2017) ในทางกลับกันวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave-assisted extraction, MAE) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เปลืองตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดสั้น และได้ปริมาณผลผลิตที่สูง (Wang & Weller, 2006) การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถกระจายพลังงานให้กับตัวทำละลายและเมทริกซ์พืชที่เป็นของแข็งได้อย่างสม่ำเสมอ มีงานวิจัยที่มีการนำวิธี MAE ไปสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดกินได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50-180°C (Smiderle et al., 2017; Zeng, Zhang, Gao, Jia, & Chen, 2012; Wang et al., 2010) พบว่างานวิจัยที่สกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดสกุลนางรม ใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นทำให้ได้ปริมาณเบต้ากลูแคนมากขึ้น และใช้เวลาในการสกัดลดลงด้วย

งานวิจัยนี้จึงมีแนวความคิดที่จะศึกษาผลกระทบของวิธี MAE ต่อปริมาณสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนดอกค้ำงและดอกตะกอน เช่น เบต้ากลูแคน สารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้อุณหภูมิในการสกัด 80, 100, 120, และ 140°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min ศึกษาลักษณะทางกายภาพของผงเห็ด (native-MR) และส่วนดอกตะกอน นอกจากนี้ผงเห็ดยังถูกนำมาสกัดด้วยหมอนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดแบบทั่วไปที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เท่ากัน (80, 100, 120, และ 5, 10, 15 min, ตามลำดับ) เพื่อเปรียบเทียบผลการสกัดกับวิธี MAE

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในส่วนของวัตถุประสงค์ของงานวิจัย มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดปริมาณสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี MAE

1.2.2 เพื่อศึกษาศึกษาผลกระทบของวิธี MAE ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน

1.2.3 เพื่อศึกษาศึกษาผลกระทบของวิธี MAE ต่อลักษณะทางเคมีกายภาพของผงเห็ด (native-MR) ส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัยคือ เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing) ส่วนฟรุตติงบอดี

1.3.2 งานวิจัยจะถูกดำเนินการในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale) เท่านั้น

1.3.3 การวิจัยนี้ทำการสกัดเบต้ากลูแคนด้วยเครื่องไมโครเวฟรุ่น Multiwave 3000 SOLV (Anton Paar, Austria)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี MAE

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้กล่าวถึงรายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการสัคตสารเบต้ากลูแคนด้วยคลื่นไมโครเวฟ ประกอบด้วย ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับเห็ด การจำแนกประเภทส่วนประกอบของดอกเห็ด องค์ประกอบทางเคมีของเห็ด เห็ดนางฟ้าภูฐาน โครงสร้างเบต้ากลูแคน การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเบต้ากลูแคนในเห็ด หลักการวิธีการสัคตด้วยคลื่นไมโครเวฟ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสัคตสารด้วยคลื่นไมโครเวฟและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 เห็ด (Mushroom)

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มอาณาจักรฟังไจ (kingdom Fungi) หรือเห็ดรา นักจุลชีววิทยาถือว่าเห็ดเป็นกลุ่มเชื้อราชั้นสูงเพราะมีเส้นใยขนาดใหญ่ที่สามารถถักทอรวมกันจนเกิดเป็นดอกเห็ดได้ ซึ่งมีวงจรชีวิตที่สลับซับซ้อนกว่าเชื้อราทั่วไป สำหรับนักพฤกษศาสตร์มองว่าเห็ดเป็นพืชชั้นต่ำ เนื่องจากไม่มีโครงสร้างภายในเซลล์ที่เรียกว่าคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์แสง (non-photosynthesis) ได้เหมือนพืช จึงไม่สามารถผลิตอาหารได้ด้วยตนเอง ต้องดำรงชีวิตด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ได้แก่ ซากพืช ซากสัตว์ อินทรีย์วัตถุ โดยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารไปใช้ และต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง

2.1.1 การจำแนกประเภทของเห็ด

เห็ดบนโลกใบนี้มีจำนวนหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกประเภทของเห็ดได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ใช้เป็นอาหาร เห็ดกลุ่มทางการแพทย์ และกลุ่มเห็ดที่มีพิษ

1) กลุ่มที่ใช้เป็นอาหาร (edible mushrooms) โดยปกติพบได้ทั่วไปในป่าของประเทศไทยและจะพบบ่อยในฤดูฝน นิยมนำมาใช้ประกอบอาหารเนื่องจากมีรสชาติอร่อย และยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารที่สำคัญ เช่น วิตามิน แคลเซียม โปรตีน มีไขมันต่ำ จึงได้มีการนำมาเพาะเลี้ยงจนกลายเป็นเห็ดเศรษฐกิจ เห็ดฟาง เห็ดสกุลนางรม เห็ดหูหนู ซึ่งเป็นเห็ดที่คนไทยนิยมบริโภค

2) กลุ่มเห็ดทางการแพทย์ (medicinal mushrooms) คือเห็ดที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายอย่าง เช่น ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น เห็ดยามาบูชิตาเกะ เห็ดไมตาเกะ เห็ดมัดสีตาเกะ เห็ดถั่งเช่า ซึ่งสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้

3) กลุ่มเห็ดที่มีพิษ (Poisonous mushrooms) เป็นเห็ดที่ไม่สามารถนำมารับประทานได้เนื่องจากมีสารพิษ ถ้ารับประทานเห็ดที่มีพิษเข้าไปจะมีอาการเมา ร่าเริง ปวดหัว อาเจียน ชัก หมดสติ หรือรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของสารพิษในเห็ด เช่น เห็ดสองวัว เห็ดระโงกหิน เห็ดหิ่งห้อย



รูปที่ 2.1 เห็ดชนิดต่างๆ: (A) เห็ดฟาง (B) เห็ดยามาบูชิตาเกะ (C) เห็ดระโงกหิน (D) เห็ดหิ่งห้อย

2.1.2 ส่วนประกอบของดอกเห็ด เห็ดประกอบไปด้วย “เส้นใยขนาดเล็ก” (hypha) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อสปอร์ (spore) จากดอกเห็ดไปตกอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และสามารถเจริญต่อไปเป็นกลุ่มใยรา (mycelium) ซึ่งจะแพร่กระจายเป็นบริเวณอยู่ใต้ดิน และจะพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่โผล่พ้นดิน เรียกว่า “ฟรุตติงบอดี้” (fruiting body) หรือส่วนที่เป็นดอกเห็ดซึ่งทำหน้าที่สร้างสปอร์โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของเห็ดจะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนี้

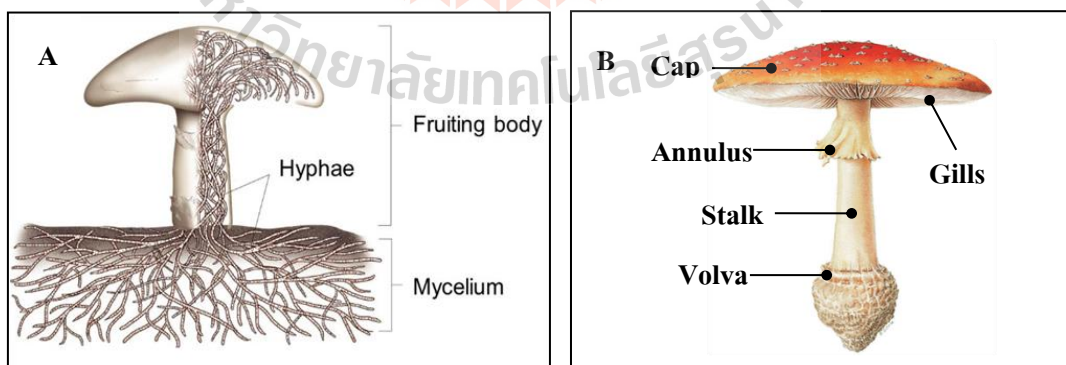
หมวกดอก (Cap หรือ pileus) เป็นส่วนปลายสุดของดอกที่เจริญเติบโตไปในอากาศ มีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น รูประฆัง รูปกรวย รูปปากแตร ผิวหมวกเห็ดด้านบนอาจจะมีลักษณะทั้งแบบเรียบ ขรุขระ หรือมีเกล็ด (scale) ขน มีสีแตกต่างกัน เนื้อของดอกเห็ด (context) จะหนาบางแตกต่างกัน อาจจะมีเหนียวหรือฉีกขาดได้ง่าย

ครีบก (Gills หรือ lamella) มีลักษณะเรียงเป็นซี่แตกเป็นรัศมีรอบก้านดอกซึ่งอยู่ทางด้านล่างหมวกดอกเห็ด อาจยึดติดหรือไม่ยึดติดกับก้านดอกก็ได้ เห็ดแต่ละชนิดจะมีจำนวนครีบกดอก ครีบกเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์

วงแหวน (Ring หรือ Annulus) มีลักษณะเป็นวงแหวนหรือม่าน (Vein) เมื่อยังเป็นดอกอ่อนจะมีเนื้อเยื่อบาง ๆ สำหรับยึดขอบหมวก และก้านดอก (stipe) ของให้ติดกัน เยื่อดังกล่าวจะขาดออกจากขอบหมวกเมื่อดอกบานออก แต่ยังคงมีบางส่วนที่ยึดติดกับก้านดอก คล้ายกับมีวงแหวนบาง ๆ สวมอยู่เรียกว่า เยื่อขอบหมวก (inner veil หรือ partial veil)

ก้านดอก (stalk หรือ stipe) มีสี ขนาด รูปร่าง แตกต่างกันไปแต่ส่วนมากลักษณะของก้านดอกจะเป็นรูปทรงกระบอก ส่วนบนจะยึดติดกับหมวกเห็ดหรือครีบกหมวกด้านใน ภายในเนื้อก้านประกอบไปด้วยเส้นใยหยาบที่สานกันแน่นทึบ แข็ง หรือสานกันอย่างหลวม ๆ คล้ายฟองน้ำ เห็ดบางชนิดไม่มีก้าน เช่น เห็ดเผาะ เห็ดหูหนู

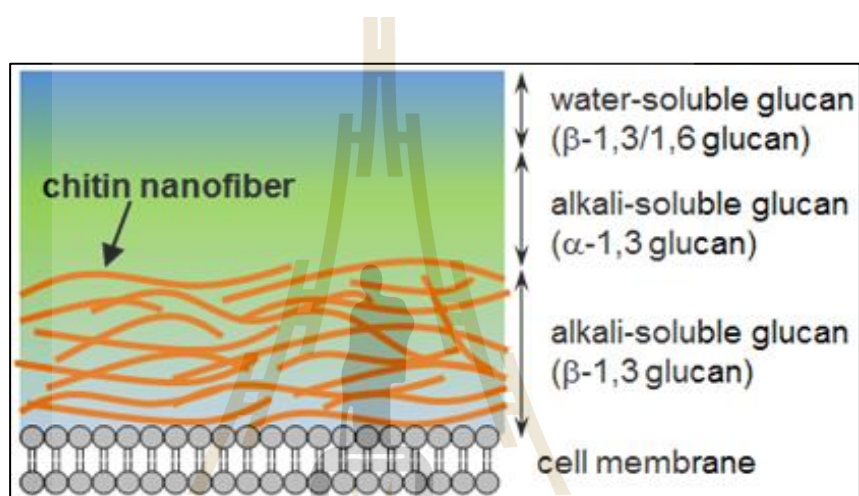
ปลอกหุ้มดอกเห็ด (volva, outer veil หรือ universal veil) เป็นเยื่อชั้นนอกสุด ที่คอยหุ้มดอกเห็ดเอาไว้ในระยะเวลาที่ยังเป็นดอกอ่อนเรียกว่า “outer veil” แต่เมื่อดอกเห็ดโตขึ้นเปลือกหุ้มตอนบนจะแตกออก เพื่อให้หมวกเห็ดและก้านดอกยึดตัวชูสูงขึ้นมาในอากาศ และทิ้งให้เปลือกหุ้มอยู่ที่โคนก้าน



รูปที่ 2.2 โครงสร้างส่วนประกอบของเห็ด: (A) ส่วนประกอบที่เป็น Fruiting body และ Mycelium (B) ส่วนประกอบต่าง ๆ โดยทั่วไปของเห็ด

2.1.3 โครงสร้างทางเคมีของเห็ด (Chemical structure of mushroom)

โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของเห็ดจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น โดยชั้นในสุดประกอบด้วยส่วน alkaline-insoluble glucan (1→3)- β -D-glucan และไคติน (chitin) เป็นจำนวนมาก สำหรับเนื้อเยื่อส่วนกลางประกอบด้วย alkaline-soluble glucan (1→3)- α -D-glucan และเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดประกอบด้วยกลูแคนที่ละลายน้ำได้ (water-soluble glucan) คือ (1→3, 1→6)- β -glucan ซึ่งมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) (Pramanik, Mondal, Chakraborty, Rout, & Islam, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของเห็ดประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น

(Ifuku, Nomura, Morimoto, and Saimoto 2011)

2.1.4 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ด (Chemical compositions of mushroom)

ในเห็ดมีคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 3-28 (ประมาณร้อยละ 50-80 ของน้ำหนักแห้ง) ส่วนเส้นใยมีประมาณร้อยละ 3-32 (พรอริยา นิรินัง, 2548) คาร์โบไฮเดรตในเห็ดส่วนใหญ่อยู่ในรูปพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นสารที่ประกอบจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) หลายชนิดมายึดติดกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkages) ส่วนมากจะพบในผนังเซลล์ของเห็ดราว 50-90% นอกจากนี้ยังพบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ เช่น ไกลโคเจน (glycogen) ไคติน ไซแลน (xylan) และเซลลูโลส (cellulose) (Synytsya et al., 2009) กลูโคสคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นโครงสร้างหลักต่อกันเป็นสายยาวกลับกันไปมาเรียกว่า เบต้ากลูแคน (β -glucan) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเห็ดมีโครงสร้างที่หลากหลาย เช่น (1→3, 1→6)- β -glucan, (1→3, 1→4)- β -glucan และ (1→3)- α -D-glucan ซึ่งมีคุณสมบัติทางด้านการ

ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

โปรตีน (Protein) เห็ดเป็นแหล่งโปรตีนจากธรรมชาติ ในเห็ดมีปริมาณโปรตีนประมาณ 0.8-3.5 g/ 100 g ของน้ำหนักเปียกหรือร้อยละ 19-35 ของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (Zrodowski, 1995) ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว ขนาดของหมวกเห็ด และชนิดของเห็ด มีผลต่อปริมาณโปรตีนในเห็ด (Bernas, Jaworska, & Lisiewska, 2006) เห็ดมีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ ไลซีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน เมทไธโอนีน ฟีนิลอะลานีน และฮิสติดีนเท่ากับร้อยละ 72-98 ของเนื้อสัตว์ ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นใกล้เคียงกับเนื้อสัตว์มาก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ลิวซีนและไลซีนคือกรดอะมิโนจำเป็นที่พบมากที่สุด ส่วนกรดอะมิโนจำเป็นที่พบน้อยที่สุดคือ ทริปโตเฟน และเมทไธโอนีน (Chang & Miles, 2004) (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.1 ดัชนีของกรดอะมิโนจำเป็นและครรชนีทางโภชนาการของเห็ดเปรียบเทียบกับเนื้อสัตว์ต่าง ๆ

ชนิดอาหาร	Essential amino acid index	Amino acid scores	Nutritional indexes
	(EAA)	(AAS)	(NI)
หมู ไก่ เนื้อวัว	100	100	59
เห็ด	72-98	32-89	5-28

ที่มา: Chang and Miles (2004)

ไขมัน (Fat) ในเห็ดมีปริมาณไขมันต่ำมากประมาณร้อยละ 2-8 ของน้ำหนักแห้ง พบกรดไขมันไม่อิ่มตัว มากกว่า กรดไขมันอิ่มตัว โดยพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวอย่างน้อยร้อยละ 72 ของกรดไขมันทั้งหมด (total fatty acid) ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมาก คือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ในเห็ดหอมพบกรดลิโนเลอิกเท่ากับร้อยละ 76.25 เห็ดฟางร้อยละ 69.9 เห็ดกระดุมร้อยละ 69.2 ของกรดไขมันทั้งหมด

วิตามิน (Vitamin) เห็ดเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบี 1 บี 2 และวิตามินบี 3 ซึ่งช่วยควบคุมการทำงานของระบบย่อยอาหาร นอกจากนั้นยังพบ โฟเลต (folate) ช่วยในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดแดง และหลอดเลือดของทารกพัฒนาไปยังสมองและไขสันหลัง, วิตามินบี 5, วิตามินซี และวิตามินดีอีกด้วย เห็ดบางชนิดยังมีเบต้า-แคโรทีน (β -carotene) ด้วย (วิภาวรรณ ศรีमुख, 2550)

เกลือแร่ (Mineral) เห็ดจัดเป็นแหล่งของเกลือแร่ที่สำคัญ เช่น ซีลีเนียม (selenium) ทำหน้าที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและเส้นเลือดในสมองตีบ ลดความ

เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยป้องกันและชะลอความชรา โพแทสเซียม (potassium) ทำหน้าที่ในการคงสมดุลของน้ำและเกลือแร่ เป็นสาระสำคัญในการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อต่าง ๆ ซึ่งรวมทั้งกล้ามเนื้อหัวใจ ลดการเกิดโรคความดันโลหิตสูง อัมพฤกษ์ และอัมพาต (ชญาพร นุชจันทรืศ, 2549) เกลือแร่พบมากในเห็ดมากกว่าก้านเห็ด ปริมาณเกลือแร่ขึ้นอยู่กับขนาดของเห็ด อายุ และสายพันธุ์ของเห็ด (Demirbuş, 2001)

ตารางที่ 2.2 กรดอะมิโนจำเป็นของเห็ดกินได้

Amino acid	เห็ดกระดุม (<i>Agaricus biporus</i>)	เห็ดหอม (<i>Lentinula edodes</i>)	เห็ดนางรม (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	เห็ดนางฟ้า (<i>Pleurotus sajor-caju</i>)	เห็ดฟาง (<i>Volvariella volvacea</i>)
Leucine	7.5	7.9	6.8	7.0	4.5
Isoleucine	4.5	4.9	4.2	4.4	3.4
Valine	2.5	3.7	5.1	5.3	5.4
Tryptophan	2.0	Nd	1.3	1.2	1.5
Lysine	9.1	3.9	4.5	5.7	7.1
Threonine	5.5	5.9	4.6	5.0	3.5
Phenylalanine	4.2	5.9	3.7	5.0	2.6
Methionine	0.9	1.9	1.5	1.8	1.1
Histidine	2.7	1.9	1.7	2.2	3.8
Total essential amino acid	38.9	36.0	33.4	37.6	32.9

ที่มา: Chang and Miles (2004)

ปริมาณความชื้น (Moisture content) ความชื้นเป็นตัวแปรสำคัญที่ช่วยให้เห็ดเจริญเติบโต เห็ดสดมีองค์ประกอบของความชื้น 90% และยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เห็ดเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเจริญเติบโตและเน่าเสียได้ง่ายและรวดเร็วกว่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอื่น ๆ หลังจากการเก็บเกี่ยว (Briones et al., 1992)

ดังนั้นจะเห็นว่าเห็ดมีน้ำเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 90 นอกนั้นเป็นคาร์โบไฮเดรตอยู่ระหว่างร้อยละ 3-28 เส้นใยอยู่ระหว่างร้อยละ 3-32 โปรตีนประมาณร้อยละ 3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์ มีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบ คือ มีดัชนีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid index)

เท่ากับร้อยละ 72-98 ของเนื้อสัตว์ ทำให้มีรสชาติคล้ายกับเนื้อสัตว์ เห็ดโดยทั่วไปมีไขมันต่ำ ปริมาณร้อยละ 2-8 มีเกลือแร่ และวิตามิน องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดส่วนที่กินได้แสดงในตารางที่ 3

2.1.5 เห็ดนางฟ้าภูฐาน (Grey Oyster Mushroom)

เห็ดนางฟ้าภูฐานมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. ถูกค้นพบครั้งแรกที่แถบเทือกเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย จัดอยู่ในสกุล *Pleurotus* (oyster mushroom) เช่นเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป่าฮือ จึงถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “เห็ดแขก” ซึ่งเป็นที่นิยมในหลายประเทศ เช่น ไทย มาเลเซีย จีน อินเดีย ญี่ปุ่น เป็นต้น ถูกนำเข้ามาจากประเทศภูฐาน โดยคุณอานนท์ เอื้อตะกูด เมื่อปี 2526 (อานนท์, 2527) เห็ดนางฟ้าภูฐานมีดอกสีขาวจนถึงสีน้ำตาลอ่อน ก้านดอกยาวสีขาว ไม่มีวงแหวนล้อมรอบ เป็นเห็ดเศรษฐกิจที่มีความนิยมของตลาดอย่างแพร่หลาย เพราะเพาะง่ายและใช้ระยะเวลาสั้น เพาะได้เกือบทุกฤดูยกเว้นในช่วง ฤดูร้อน เพราะเห็ดชอบอากาศเย็นชื้น ออกดอกเห็ดเร็วกว่าเห็ดชนิดอื่น ๆ มีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ ดอกนุ่ม เนื้อแน่น มีรสชาติอร่อย อุดมไปด้วยเส้นใยมีประโยชน์ในด้านโภชนาการ ให้พลังงานและไขมันต่ำ จึงกลายเป็นหนึ่งในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการช่วยควบคุมหรือลดน้ำหนักได้ ผู้บริโภคนิยมนำมาใช้ประกอบอาหาร เช่น แกง ต้มยำ ซุป แป้งทอด

2.1.5.1 องค์ประกอบของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

Gutiérrez and Martínez (1996) ได้ศึกษาองค์ประกอบของเห็ดสกุล *Pleurotus* ในส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ (extracellular polysaccharide) และส่วนที่ละลายน้ำได้ (water soluble) พบว่าส่วนพอลิแซ็กคาไรด์มี 85% ของทั้งหมดซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเห็ด ประกอบด้วยกลูโคส 93% และแมนแนน 7% ส่วนที่ละลายน้ำได้มี 15% ของทั้งหมด ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน แมนแนน (mannan) กาแลกโทส (galactose) และกลูโคส (glucose) คิดเป็น 27, 31, 12, และ 30%, ตามลำดับ (Gutiérrez & Martínez, 1996)

2.1.5.2 วงจรชีวิตของเห็ดนางฟ้าภูฐาน (Life Cycle)

วงจรชีวิตของเห็ดนางฟ้าภูฐานเป็นวงจรชีวิตเห็ดแบบต้องผสม (Heterothallic) คือเมื่อดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานโตเต็มที่จะสร้างสปอร์บริเวณครีบ และปล่อยออกมาเป็นระยะๆ เมื่อแก่ หากสปอร์ปลิวไปตกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเจริญไปเป็นเส้นใยขั้นแรก (Primary Mycelium) หรือเป็นได้เฉพาะเส้นใยมี 1 นิวเคลียส ซึ่งไม่สามารถพัฒนาตัวเองให้เป็นเส้นใยระยะที่ 2 (Secondary Mycelium) ได้ ซึ่งจะต้องเกิดจากเส้นใยขั้นที่ 1 จากสปอร์อื่นที่เจริญเต็มที่แล้วมาผสมกัน ซึ่งเป็นการถ่ายทอดนิวเคลียสให้มาอยู่ในเซลล์เดียวกัน กลายเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 แล้วจะเจริญรวมกันเป็นกลุ่มก้อนพัฒนาเป็นดอกเห็ดและสร้างสปอร์ต่อไป

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดส่วนที่กินได้ 100 g

ชนิดเห็ด	น้ำ (g)	พลังงาน (cal)	ไขมัน (g)	คาร์โบไฮ ^๑ (g)	โปรตีน (g)	เส้นใย (g)	เถ้า (g)	เกลือแร่			วิตามิน			
								แคลเซียม (mg)	เหล็ก (mg)	ฟอสฟอรัส (mg)	บี 1 (mg)	บี 2 (mg)	ไนอาซิน (mg)	ซี (mg)
1.เห็ดหอม	92.40	21.55	0.043	2.95	2.34	1.308	0.625	2.30	2.22	58.59	0.001	0.24	3.23	0
2.เห็ดนางรม	90.70	32.39	0.043	5.67	2.13	0.396	0.543	1.32	1.08	55.76	0.004	0.06	8.04	0.82
3.เห็ดนางฟ้า	90.27	33.32	0.071	4.79	3.36	0.472	0.642	1.90	0.86	87.44	0.006	0.08	3.21	3.56
4.เห็ดฟาง	89.90	32.38	0.071	4.75	3.16	0.595	0.986	5.56	1.27	105.81	0.011	0.14	2.87	0.67
5.เห็ดโคน	84.90	48.72	0.280	5.28	6.27	1.963	1.293	8.64	3.04	135.11	0.095	0.50	9.24	0
6.เห็ดหูหนู*	87.10	50.00	0.100	10.90	1.40	1.80	0.500	60.00	6.10	-	-	-	2.80	21.00
7.เห็ดขมิ้น**	-	-	0.500	2.30	2.70	-	-	2.00	1.60	17.00	0.03	0.44	3.70	7.00
8.เห็ดเป่าฮือ**	-	-	0.200	3.20	3.40	-	-	-	22.2	18.00	9.7	0.47	3.0	7.00
9.เห็ดกระดุม	90.50	-	0.200	-	4.70	-	-	9.00	5.70	-	-	-	-	-
10.เห็ดขมิ้น**	-	-	0.500	2.30	2.70	-	-	2.00	1.60	17.00	0.03	0.44	3.70	7.00
11.เห็ดเข็มทอง***	-	34.00	0.400	7.00	2.40	2.60	-	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา: วิทยารณ ศรีมุข,2550

หมายเหตุ: ข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก

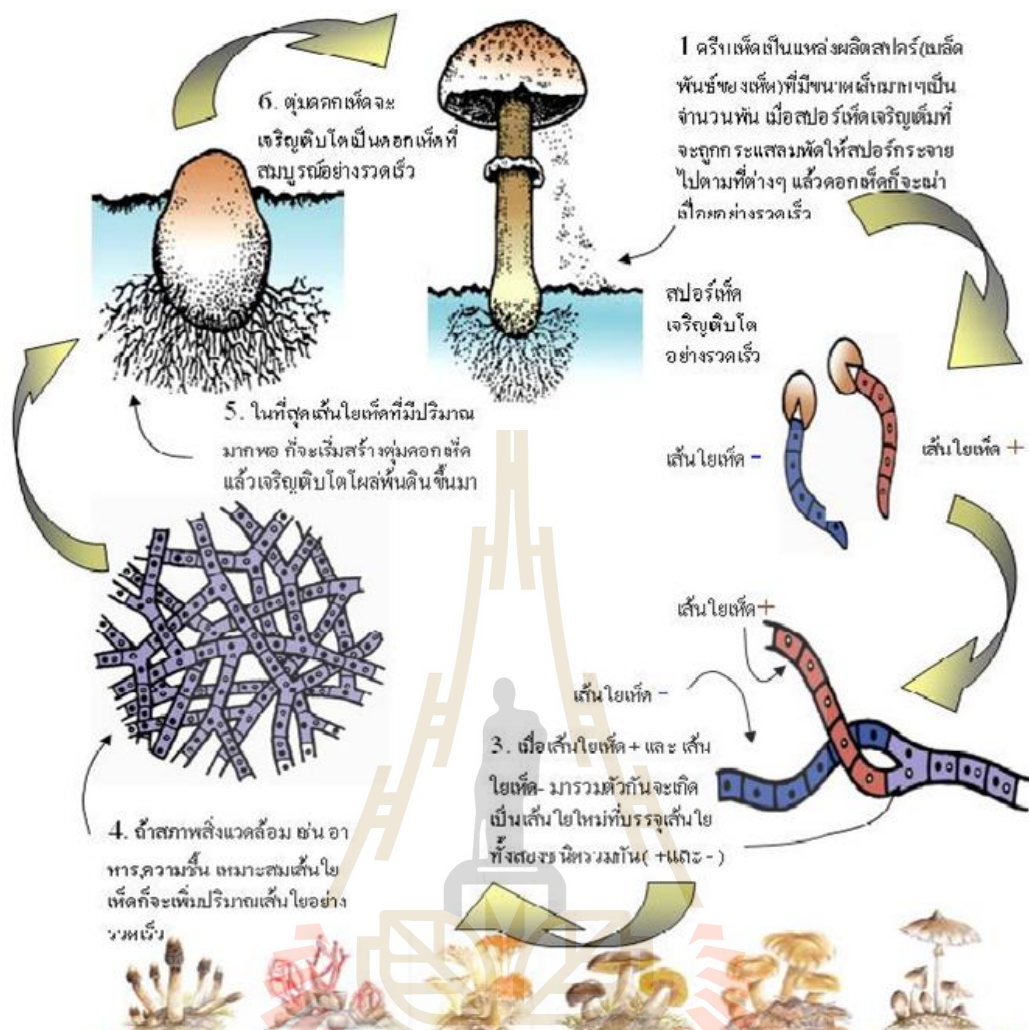
คาร์โบไฮ^๑= คาร์โบไฮเดรต

*= วิเคราะห์โดยจากกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

**=สาธิต ไทยทัตกุล, 2546

***= นรินาม, 2548

- = ไม่มีการวิเคราะห์



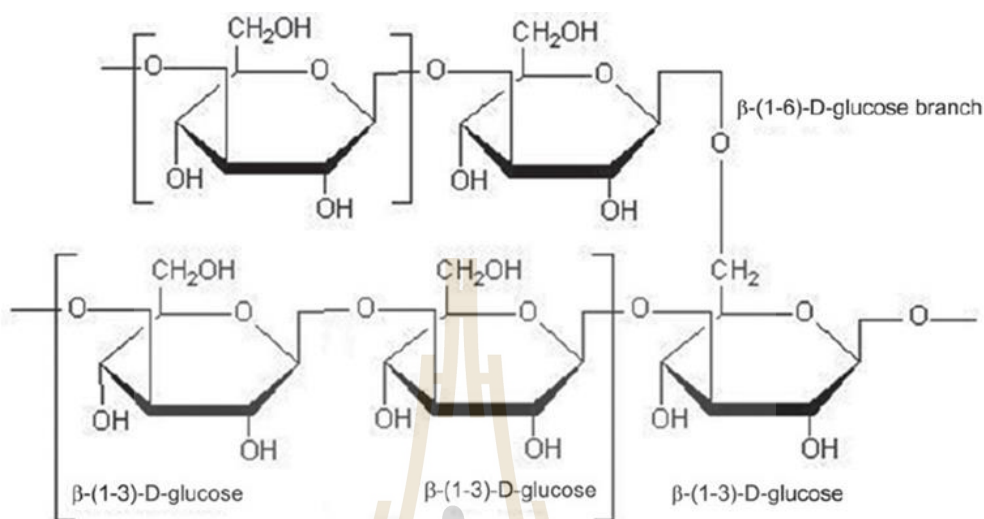
รูปที่ 2.4 วงจรชีวิตของเห็ดนางฟ้า (ที่มา: บุญเลิศ ไททัตกุล, 2551)

2.2 เบต้ากลูแคน (β -glucan)

2.2.1 เบต้ากลูแคนคืออะไร

เบต้ากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากสารประกอบน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ที่เป็นรูปร่างวงแหวน 6 ด้านหลายโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) พบได้ในผนังเซลล์ของยีสต์ เห็ด ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ และแบคทีเรียบางชนิด เบต้ากลูแคนที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสภาพการละลายน้ำ ความยาวของสายพอลิแซ็กคาไรด์ ความยาวของของเส้นแขนงที่เชื่อมต่อ รวมทั้งคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปด้วย โดยส่วนใหญ่แล้วเบต้ากลูแคนจะมี (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan เป็นโครงสร้างหลัก (back bone) ที่มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 1

จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลกลูโคสตัวถัดไป และมีสายกิ่ง (branch) คือ (1→6)-β-D-glucan ที่แตกแขนงออกไปจากโครงสร้างหลักหรือไม่มีสายกิ่งก็ได้







รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ (1→3,1→6)-β-D-glucan

(Rahar, Swami, Nagpal, & Singh, 2011)

2.2.2 โครงสร้างของเบต้ากลูแคน (Structure of β-glucan)

เบต้ากลูแคนจากแหล่งที่มาต่าง ๆ จะมีลักษณะการจัดเรียงตัวกันของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือน้ำตาลกลูโคสที่ไม่เหมือนกัน จึงทำให้เบต้ากลูแคนแต่ละแหล่งที่มาที่มีโครงสร้างที่ต่างกันออกไป เช่น เบต้ากลูแคนที่มีแหล่งที่มาจากรั้วพืช จำพวก ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงไม่มีสายกิ่ง เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะ (1→4)-β-glycosidic (ประมาณร้อยละ 70) และ (1→3)-β-glycosidic (ประมาณร้อยละ 30) จึงถูกเรียกว่า (1→3,1→4)-β-D-Glucans สำหรับยีสต์มี (1→3)-β-D-glucan เป็น โครงสร้างหลักและมีพันธะ (1→6)-β-glycosidic ที่เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักแยกออกไปเป็นแขนง จึงถูกเรียกว่า (1→3,1→6)-β-D-glucan ซึ่งโครงสร้างเบต้ากลูแคนจากยีสต์จะแตกต่างจากราและเห็ดที่ ยีสต์จะมีสายแขนงที่ยาวกว่า สำหรับเบต้ากลูแคนจากแบคทีเรียจะมีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงเรียกว่า Curdlan เป็นการเชื่อมต่อกันของ (1→3)-β-D-Glucan (Volman, Ramakers, & Plat, 2008) ดังแสดงดังในตารางที่

ตารางที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างอย่างง่ายของเบต้ากลูแคนจากแหล่งที่มาชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสาร เบต้ากลูแคน (Type of β -glucan)	โครงสร้าง (Structure)	คำอธิบายโครงสร้าง (Description)
แบคทีเรีย (Bacteria)		(1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan เรียง เป็นเส้นตรง ไม่มีแขนง
ยีสต์ (Yeast)		(1 \rightarrow 3)- β -D- Glucan เป็น เส้นตรงหรือโครงสร้างหลัก และมี (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D- glucan เป็นแขนงที่มีสายยาว
รา (Fungi) และเห็ด (Mushroom)		(1 \rightarrow 3)- β -D- Glucan เป็น เส้นตรงหรือโครงสร้างหลัก และมี (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D- glucan เป็นแขนงที่มีสายสั้น
ข้าวบาร์เลย์ (Barley) และข้าวโอ๊ต (Oat)		(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucan เรียงเป็นเส้นตรง

ที่มา: Volman et al. (2008)

2.2.3 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเบต้ากลูแคนในเห็ด

2.2.3.1 ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน (Immunomodulating activity)

Rout และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus florida*) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อแล้วให้สารเบต้ากลูแคน พบว่าเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีการเพิ่มขึ้นทั้งขนาดและจำนวน ทั้งเซลล์ thymocyte, macrophage และ splenocyte (Rout, Mondal, Chakraborty, Pramanik, & Islam, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manzi และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของเบต้ากลูแคนจากเห็ดถ่านเล็ก (*Russula albonigra* (Krombh.) Fr.) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) พบว่าเซลล์ splenocyte และ thymocyte เพิ่มขึ้นทั้งขนาดและจำนวน (Nandi et al., 2014)

Kodama, Komuta, and Nanba (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จากเห็ดชิตาเกะ (*Grifola frondosa*) โดยทำการทดสอบฤทธิ์ผู้ป่วยมะเร็งที่มีอายุระหว่าง 22–57 ปี ในระยะที่ 2-4 พบว่าหลังรับประทานสารเบต้ากลูแคน

ต่อเนื่องกัน 50 วัน อาการของผู้ป่วยดีขึ้น คิดเป็น 62.5% ในผู้ป่วยมะเร็งปอด 58.3% ในผู้ป่วยมะเร็งตับ และ 68.8% ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จากข้อมูลการศึกษาและตัวอย่างข้างต้นเป็นการยืนยันและสนับสนุนว่าเบต้ากลูแคนจากเห็ดมีฤทธิ์ในแง่ของการกระตุ้นการเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2.2.3.2 ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอก (Anti-tumor activity)

Wasser (2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดในกลุ่ม Basidiomycetes พบว่าสารเบต้ากลูแคนที่มีโครงสร้าง (1→3)-glycosidic linkage สามารถยับยั้ง Sacroma 180 solid cancer และ Ehrlich solid cancer ช่วยยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอกได้

การวิจัยของ Gao, Zhou, Jiang, Huang, and Dai (2003) และคณะได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอกของสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ในผู้ป่วยมะเร็ง ผลการทดลองพบว่าหลังจากให้สารเบต้ากลูแคนเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ปริมาณของ Interleukin-2, Interleucin-6 และ IFN-GAMMA ในเลือดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยป้องกันรังสีและลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากการทำเคมีบำบัดของผู้ป่วยมะเร็ง (Zhu et al., 2015) ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยลดขนาดของเนื้องอกมะเร็งในมะเร็งลำไส้ได้ (Chen, Zhang, & Jiang, 2013)

2.2.3.3 ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด (Anti-lipidemia activity)

Alam et al. (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii*) ในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวานและไขมันในเลือดสูงเป็นเวลาต่อเนื่อง 7 สัปดาห์ พบว่าสารเบต้ากลูแคนมีฤทธิ์ลดระดับ total cholesterol triglyceride และเพิ่มระดับ high density lipoprotein (HDL)-cholesterol อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน

ผลการวิจัยของ Handayani, Chen, Meyer, and Huang (2011) ที่ได้ศึกษาเห็ดชิตาเกะ (*Lentinus edodes*) ที่มีฤทธิ์ในการลดระดับไขมันในเลือด โดยทดลองในหนูจำนวน 40 ตัวที่ถูกทำให้อ้วนด้วยอาหารไขมันสูง (high fat diet induced) พบว่าหลังการให้ผงเห็ด (shiitake mushroom powder) ที่ประกอบด้วย 30% β -glucan (w/w) แก่หนูเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หนูในกลุ่มที่ได้รับผงเห็ดในขนาดสูง มีมวลไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับผงเห็ดในขนาดต่ำและกลุ่มที่ไม่ได้รับผงเห็ด นอกจากนี้หนูในกลุ่มที่ได้รับผงเห็ดในขนาดสูงยังสามารถลด body fat index มากกว่าหนูในกลุ่มที่ไม่ได้รับผงเห็ด

2.2.3.4 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Anti-diabetes activity)

ในปี 2004 Gao และคณะ ได้ทำการทดลองในมนุษย์โดยนำสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ทดลองกับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type

2 of diabetes) จำนวน 71 ราย เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือด ภายหลังรับประทานอาหาร (Post-prandial glucose) ลดลงเฉลี่ย 11.8 mmol. (Gao, Lan, Dai, Ye, & Zhou, 2004) และงานวิจัยของ (Jantaramanant et al., 2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสารเบต้า กลูแคนที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากเห็ดฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.) พบว่ามีฤทธิ์เพิ่มการ นำกลูโคสเข้าเซลล์กล้ามเนื้อเพาะเลี้ยง

2.2.3.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation activity)

Jose, Ajith, and Janardhanan (2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเบต้า กลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius*) พบว่ามีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูทดลองที่ ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย formalin เมื่อเปรียบเทียบกับยาไดโคลฟีแนค (diclofenac)

งานวิจัยของ Ruthes et al. (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารเบต้า กลูแคนในเห็ด *Lactarius rufus* โดยทดลองในหนู Swiss mice ขนาด 25-35 g ทำการฉีด formalin ความเข้มข้น 2.5% ปริมาณ 20 μ L เข้าไปยังฝังฝีใต้ผิวหนังด้านหลังของหนูเพื่อให้เกิดการ อักเสบของอุ้งเท้าพบว่าผลของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ด *Lactarius rufus* มีฤทธิ์ระงับ อาการปวดที่เกิดจากระบบประสาท (Neurogenic pain)

2.2.3.6 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Anti-bacterial activity)

Bergendiova, Tibenska, and Majtan (2011) ได้ทำการทดลองฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) ในอาสาสมัครที่เป็น นักกีฬาเพศชาย จำนวน 50 ราย เป็นเวลา 3 เดือนผลการทดสอบพบว่า การติดเชื้อในระบบทางเดิน หายใจ (upper respiratory tract infection) และการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของอาสาสมัคร ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและผลการทดลองของ (Cai, Lin, Luo, Liang, & Sun, 2015) ซึ่งให้เห็นว่าสารสกัดบีตากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดหูหนู (*Auricularia auricular-judae*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เมื่อพิจารณาจาก Inhibition zone

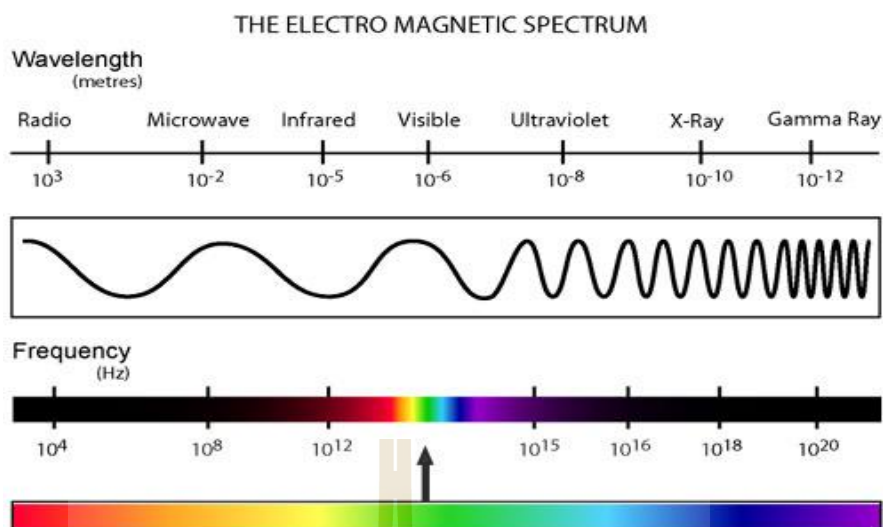
2.3 วิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

วิธีการสกัดสารเบต้ากลูแคนในปัจจุบันมีหลายวิธีแบ่งเป็นการสกัดแบบดั้งเดิม (Traditional method) และการสกัดแบบใหม่ (Modern method) วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การสกัดแบบซอกท์ เลต (Soxhlet extraction) การสกัดด้วยวิธีการแช่ (Maceration) เป็นวิธีการสกัดที่ง่ายแต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลาในการสกัดนานและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นพิษต่อ ร่างกายและสิ่งแวดล้อม การใช้คลื่นไมโครเวฟในการสกัดสารเป็นหนึ่งในวิธีแบบใหม่ที่ได้รับความ นิยมมากขึ้น โดยพลังงานไมโครเวฟถูกนำส่งโดยตรงไปยังสมุนไพรผ่านอันตรกิริยาระดับ

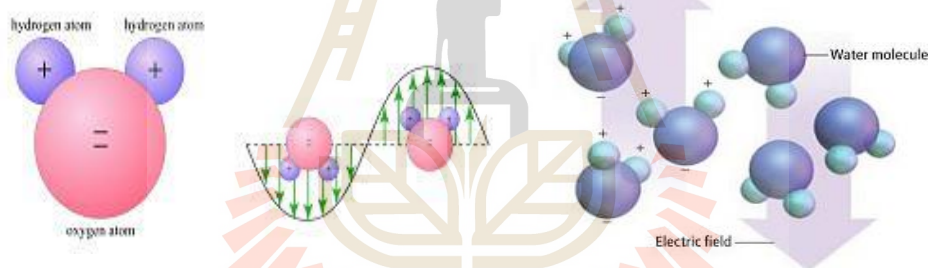
โมเลกุล (molecular interaction) ด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้าผ่านการเปลี่ยนแปลงพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าไปเป็นพลังงานความร้อน จึงทำให้มีความสะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมได้

2.3.1 หลักการของการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ

คลื่นไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic spectrum) ที่อยู่ระหว่างคลื่นอินฟราเรดและคลื่นวิทยุ มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่าง 0.001 ถึง 1.00 m มีความถี่อยู่ในช่วง 3×10^2 ถึง 3×10^5 MHz ดังแสดงในรูปที่ 2.6 หลักการของการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟในการสกัดร่วมกับตัวทำละลายคือ อาศัยการส่งผ่านคลื่นไมโครเวฟไปยังเซลล์ของวัตถุที่ต้องการนำมาสกัดด้วยสนามแม่เหล็กไฟฟ้า แล้วเปลี่ยนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าไปเป็นพลังงานความร้อน โดยกระบวนการทำความร้อนของคลื่นไมโครเวฟ เกิดจากกระบวนการถ่ายเทพลังงานจาก 2 กลไก คือ dipole rotation เมื่อโมเลกุลในสารละลายมีขั้วเป็นองค์ประกอบ เช่น น้ำ โดยธรรมชาติน้ำจะมีประจุบวกและลบเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (random oriented) หากประจุเหล่านี้ที่อยู่ภายใต้การเคลื่อนที่ของคลื่นไมโครเวฟ ประจุบวกและลบในโมเลกุลจะหมุนตัวเพื่อเปลี่ยนทิศตามการเปลี่ยนแปลงของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าภายใต้ความถี่ 2450 MHz คลื่นไมโครเวฟเปลี่ยน electric component ด้วยความเร็ว 4.9×10^4 ครั้งต่อวินาที จนส่งผลทำให้เกิดเป็นความร้อนขึ้น และอีกหนึ่งกลไกคือ ionic conduction เมื่อโมเลกุลในสารละลายเข้าไปอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า ประจุไฟฟ้าภายในโมเลกุลจะถูกกระตุ้นเกิดการสั่นและเร่งให้เคลื่อนที่ จึงเกิดการชน หรือเสียดสีกับอนุภาคที่อยู่ข้างเคียง เป็นผลให้เกิดความร้อนขึ้นภายในเซลล์ ตามหลักการที่กล่าวมาข้างต้นจะเกิดแรงดันขึ้นภายในเซลล์ ทำให้เซลล์แตกและปล่อยสารสำคัญที่อยู่ภายในออกมาผสมกับตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Kaufmann, Christen, & Veuthey, 2001) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดทำให้ได้สารสำคัญที่มีประสิทธิภาพสูงเนื่องจากไม่เปลืองตัวทำละลาย ช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตของสารสกัดที่ได้ (Wang and Weller, 2006) และช่วยป้องกันการสลายตัวขององค์ประกอบสำคัญที่สกัดได้ ลดเวลาในการสกัดและเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 2.6 สเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Shapley, 2012)



รูปที่ 2.7 โมเลกุลของตัวทำละลายที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทางของสนามไฟฟ้า (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, 2555)

นอกจากนี้ค่าความร้อนที่เกิดขึ้นจากคลื่นไมโครเวฟยังขึ้นอยู่กับความสามารถของตัววัสดุในการดูดซึมพลังงานไมโครเวฟและกระจายความร้อนไปยังโมเลกุลข้างเคียง เรียกว่า Dissipation factor ($\tan \delta$) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ วัสดุที่มีค่า $\tan \delta$ และ dielectric loss หรือ loss factor (ϵ'') สูง ร่วมกับค่า dielectric constant (ϵ') ปานกลาง จะสามารถเปลี่ยนพลังงานไมโครเวฟไปเป็นพลังงานความร้อนได้ โดยความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทั้งสามประการนี้แสดงได้ดังสมการ 2.1

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (2.1)$$

โดยที่ค่า ϵ' แสดงถึงความมีขั้ว (polarity) หรือความสามารถของวัสดุในการกักเก็บพลังงานไฟฟ้าไว้ เมื่อนำมาวางในสนามไฟฟ้ากระแสสลับ ค่า ϵ'' เป็นค่าที่แสดงความสามารถของวัสดุที่จะกระจายพลังงานไฟฟ้าไปเป็นพลังงานความร้อน ถ้าค่านี้สูงแสดงว่าจะเกิดความร้อนสูง

2.3.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดสารด้วยคลื่นไมโครเวฟ

ในการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟจะมีประสิทธิภาพมากเพียงใดยังขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีสถานะที่เหมาะสม มีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ ได้แก่

ระบบตัวทำละลายและสัดส่วนของตัวทำละลายต่อผงวัตถุดิบ (Solvent nature and Solvent feed ratio, S/F ratio) การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดสาร ตัวทำละลายที่ดีจะต้องให้สารสกัดในปริมาณมาก ขึ้นอยู่การซึมผ่านของตัวทำละลายและอันตรกิริยาระหว่างแมทริกซ์ของตัวอย่าง การดูดซึมพลังงานไมโครเวฟจะมากขึ้นตามค่า ϵ' แสดงในตารางที่ 2.5 เนื่องจากตัวทำละลายที่มีขั้วและสารละลายไอออนิก สามารถดูดซับพลังงานได้มาก สำหรับสารละลายที่ไม่มีขั้วเช่น เฮกเซน จะไม่มีความร้อนเกิดขึ้นเมื่อสัมผัสคลื่นไมโครเวฟ เนื่องจากไม่สามารถดูดซึมพลังงานไมโครเวฟได้ นอกจากนี้การเลือกตัวทำละลายยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม หากนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ เวชสำอาง อาหาร ตัวทำละลายจะต้องไม่เป็นพิษต่อร่างกาย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

สัดส่วนของตัวทำละลายต่อผงวัตถุดิบเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้จะต้องมากเพียงพอที่จะท่วมผงวัตถุดิบได้ตลอดเวลาในการสกัด เนื่องจากผงวัตถุดิบบางชนิดมีการพองตัวมากขึ้นเมื่ออยู่ในตัวทำละลาย หากใช้ปริมาณตัวทำละลายที่น้อยเกินไปก็จะไม่เพียงพอในการสกัด หรือหากใช้ตัวทำละลายที่มากเกินไป ก็จะทำให้สิ้นเปลืองตัวทำละลายได้

กำลังไมโครเวฟและอุณหภูมิ (Microwave power and temperature) จะแปรผันตามกัน เมื่อกำลังไมโครเวฟเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้อุณหภูมิสูงขึ้นด้วย ทำให้ผลผลิตจากการสกัดเพิ่มมากขึ้น คงที่ และลดลงเมื่ออุณหภูมิในระบบสูงมากเกินไป อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้ระบบการสกัดมีแรงตึงผิวและความหนืดลดลง ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายสามารถละลายสารสกัดได้ดีมากขึ้น จึงได้ปริมาณสารสกัดมากขึ้นและช่วยลดระยะเวลาในการสกัด อย่างไรก็ตามการเพิ่มกำลังไมโครเวฟอาจทำให้เกิดการสูญเสียและสลายตัวของสารสำคัญบางชนิดได้

ตารางที่ 2.5 แสดงค่าพารามิเตอร์ทางกายภาพของตัวทำละลายที่นิยมใช้ในวิธี MAE

ตัวทำละลาย	Dielectric constant ^a (ϵ')	Dissipation factor ($\tan \delta$) ($\times 10^{-4}$)	จุดเดือด ^b ($^{\circ}\text{C}$)	ความหนืด ^c (cP)
อะซิโตน	20.7	5,555	56	0.30
อะซิโตนไนไตรล์	37.5	-	82	-
เอทานอล	24.3	2,500	78	0.69
เฮกเซน	1.89	-	69	0.30
เมทานอล	32.6	6,400	65	0.54
2-โพรพานอล	19.9	6,700	82	0.30
น้ำ	78.3	1,570	100	0.89
เอทิล อะซิเตต	6.02	5,316	77	0.43
เฮกเซนอะซิโตน (1:1)	-	-	52	-

^aวัดที่อุณหภูมิ 20°C, ^bวัดที่ 101.4 kPa, ^cวัดที่อุณหภูมิ 25°C

ที่มา: Veggi, Martinez, and Meireles (2013); Songsak (2016)

ระยะเวลาการสกัดและจำนวนรอบในการสกัด (Extraction time and cycle)

การเพิ่มระยะเวลาและจำนวนรอบในการสกัดมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตจากการสกัด เมื่อเพิ่มถึงในระดับหนึ่งแล้วปริมาณสารสกัดที่ได้จะคงที่จนกระทั่งไม่สามารถสกัดเพิ่มได้อีก วิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม ดังนั้นจึงใช้พลังงานน้อยกว่า และช่วยลดการสลายตัวของสารสำคัญที่ไวต่อความร้อนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

พื้นที่ผิวสัมผัส (Matrix characteristic) การที่ขนาดของผงวัตถุดิบมีขนาดเล็กลง หรือพื้นที่ผิวของผงวัตถุดิบเพิ่มขึ้น ทำให้ตัวทำละลายสามารถซึมผ่านผงวัตถุดิบและคลื่นไมโครเวฟผ่านได้มากขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพของการสกัดสูงขึ้นด้วย

การคนหรือการเขย่าสาร (Stirring or shaking) จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการถ่ายเทมวลสาร ซึ่งการคนหรือเขย่าสารนั้นจะช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการสกัดสารช่วยเพิ่มการละลายของสารออกมาจากด้านในของผงวัตถุดิบ มีข้อดีคือช่วยลดการใช้ตัวทำละลายให้น้อยลง กล่าวคือสามารถลดสัดส่วนของตัวทำละลายต่อผงวัตถุดิบลงได้

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการที่ได้ทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาซึ่งเกี่ยวข้องกับการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ด สามารถจัดกลุ่มแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 การสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดชนิดต่าง ๆ เพื่อต้องการทราบถึงปริมาณเบต้ากลูแคนที่มีอยู่ในเห็ดแต่ละชนิด กลุ่มที่ 2 การสกัดเบต้ากลูแคนโดยพิจารณาเรื่องวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ต่อความสามารถในการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ด และกลุ่มที่ 3 การสกัดเบต้ากลูแคนโดยพิจารณาเรื่องปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่มีผลช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการสกัดเบต้ากลูแคน เพื่อที่จะได้ปัจจัยที่มีสภาวะที่เหมาะสมหรือได้รับปริมาณเบต้ากลูแคนที่มากที่สุดจากการสกัด

การพิจารณาในเรื่องของกลุ่มที่ 1 พิจารณาเรื่องการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดชนิดต่าง ๆ จากเพื่อพิจารณาปริมาณเบต้ากลูแคนที่อยู่ในเห็ดแต่ละชนิด งานวิจัยของพิชญา พานนนท์ (2555) ได้ศึกษาหาปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ด 8 ชนิด โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 °C นาน 2 h พบว่า สารสกัดจากเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) มีปริมาณเบต้ากลูแคนสูงสุด คือ 19.26 g/100 g extract รองลงมาคือ สารสกัดจากเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) (17.90) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*) (17.56) เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) (15.54) เห็ดนางรมหลวง (13.62) เห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*) (13.30) เห็ดคุด (*Lentinus polychrous*) (9.41) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvace*) (4.49) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบธาตุในเห็ดทั้ง 8 ชนิดพบว่าองค์ประกอบของเห็ดส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนในปริมาณสูงสุด ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 44.60-46.40 รองลงมาเป็นองค์ประกอบของธาตุไฮโดรเจนร้อยละ 7.30-7.70 ธาตุไนโตรเจนร้อยละ 3.80-5.30 และธาตุซัลเฟอร์ร้อยละ 1.50-1.60 ตามลำดับ และงานวิจัยของสุภารัตน์ จันทร์เหลืองและคณะ ปี 2558 ได้วิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ดป่าจำนวน 22 ชนิด และเห็ดที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าจำนวน 5 ชนิด ที่หาได้จากการใช้ชุดทดสอบหาปริมาณสารเบต้ากลูแคนของบริษัท Megazyme จะได้เป็นปริมาณของเบต้ากลูแคนแสดงค่าในรูปร้อยละของปริมาณสารเบต้ากลูแคนต่อน้ำหนักผงแห้งของเห็ด (%w/w) ว่าเห็ดป่าที่มีปริมาณสารเบต้ากลูแคนสูงที่สุด 5 ลำดับแรกคือเห็ดฟางหมู (*Russula foetens* (Pers.) Fr.) เห็ดห้าฟาน (*Mycoamaranthus cambodgensis* (Pat.) Trap.) และเห็ดชินเห็ดชิน (*Amauroderma subresinosum* (Murrill) Corner.) เห็ดคังวัว (*Russula foetens* (Per.) Fr.) เห็ดคาบยาง (*Russula* sp.) โดยมีปริมาณสารเบต้ากลูแคนเท่ากับ 43.83 ± 0.28 , 41.52 ± 1.47 , 36.61 ± 3.85 , 33.81 ± 1.03 และ 29.96 ± 1.55 %w/w สำหรับเห็ดที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้าจำนวน 5 ชนิดที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน ได้แก่ เห็ดออริจ (*Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet 1874) เห็ดหิมะขาว (*Hypsizygus tessellates*) เห็ดซิเมจิ (*Hypsizygus tessellates*) เห็ดหอม (*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.) เห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes* (Curt:

Fr.) Singer) มีปริมาณสารเบต้ากลูแคนเท่ากับ 33.42 ± 0.24 , 30.53 ± 0.26 , 26.73 ± 1.57 , 26.68 ± 1.01 และ 10.94 ± 1.33 %w/w Manzi and Pizzoferrato (2000) ได้วิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ดกินได้ชนิดต่าง ปริมาณเบต้ากลูแคนรายงานในหน่วย g/100 g on a dry basis เห็ดนางรม (0.24-0.38) เห็ดนางรมหลวง (0.22-0.38) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (0.53) และเห็ดหอม (0.22) จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณเบต้ากลูแคนแตกต่างกัน และจะเห็นว่าเห็ดในสกุลนางรม (*Pleurotus*) มีปริมาณเบต้ากลูแคนมากดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงนำเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*) มาใช้ในการศึกษา ซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่มีสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ

การพิจารณาในเรื่องของกลุ่มที่ 2 วิธีการสกัดที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (เบต้ากลูแคน) จากเห็ด ในปัจจุบันมีวิธีการสกัดที่หลากหลาย เช่น วิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การต้มด้วยน้ำร้อน การแช่ในน้ำเย็น การสกัดโดยใช้ด่าง และวิธีการที่ใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัย เช่น Ultrasound Extraction (UAE), Microwave-assisted extraction (MAE), pressurized liquid extraction (PLE) เป็นต้น

งานวิจัยของ Klaus et al. (2011) ได้ทำการสกัดเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ด้วยน้ำร้อน (HWE) เป็นการสกัดโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) 121°C 45 min และสกัดด้วยด่าง (hot alkali extracted polysaccharide; HWAE) โดยใช้ NaOH เข้มข้น 1 mol/L ที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันกับ HWE พบว่าทำให้ได้ปริมาณสารสกัด (extraction yield) เท่ากับ 4.3 และ 22.6 g/100 g of mushroom dry weight (HWE และ HWAE, ตามลำดับ) สารสกัดที่ได้จากทั้งสองวิธีถูกนำตรวจสอบปริมาณเบต้ากลูแคน โดยใช้ Mushroom and Yeast Procedure K- YBGL 09/2009 (Megazyme Int.) ได้เท่ากับ 25.1 และ 2.1 g/100 g dry weight of the extract และตรวจสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ได้เท่ากับ 63.6% และ 54.9% ที่ความเข้มข้น 10.0 mg/mL ตามลำดับ

งานวิจัยของ Carbonero et al. (2012) ได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*) โดยการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100°C (hot water extraction) และน้ำเย็น 4°C (cold water extraction) ได้รับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 11.4% และ 12.4%, ตามลำดับ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกสกัดจากน้ำร้อนถูกนำมาวิเคราะห์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวประกอบด้วย glucose (89.0%), rhamnose (4.5%), arabinose (2.2%), mannose (2.2%), และ galactose (2.1%) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกสกัดจากน้ำร้อนถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของ β -glucans ด้วย NMR Spectrometer พบว่าประกอบไป β -D-glucan ที่มีโครงสร้าง (1 \rightarrow 3)-linked เป็นแบบโซ่ตรงหรือโซ่หลักและจะมีโซ่กิ่งที่ถูกต้องออกมาจากตำแหน่ง O-6 ทุก ๆ 2-3 หน่วยของโซ่หลักน้ำตาลกลูโคส งานวิจัยของ Santos-Neves et al. (2008) ได้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากจากเห็ด

นางรม (*Pleurotus florida*) โดยใช้ น้ำอุณหภูมิ 25°C นาน 6 h แล้วนำของแข็งไปสกัดด้วยน้ำร้อน อุณหภูมิ 100°C นาน 6 h แล้วนำของแข็งไปสกัดด้วย 2% KOH 100°C นาน 6 h ผลการสกัด ได้รับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 15.3%

Amaral et al. (2008) ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma resinaceum*) ด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100°C (hot water extraction) แล้วสกัดด้วยสารละลายต่าง KOH ความเข้มข้น 2% และ 5% ตามลำดับ อย่างละ 3 h พบว่าได้รับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 5.9% ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 96.5% น้ำตาลแมนโนส 1.6% น้ำตาลกาแล็กโทส 0.7% และน้ำตาลไซโลส 1.2% เป็นองค์ประกอบ เช่นเดียวกับ Li et al. (2016) สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 70°C นาน 2-3 h ได้รับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 7.1%

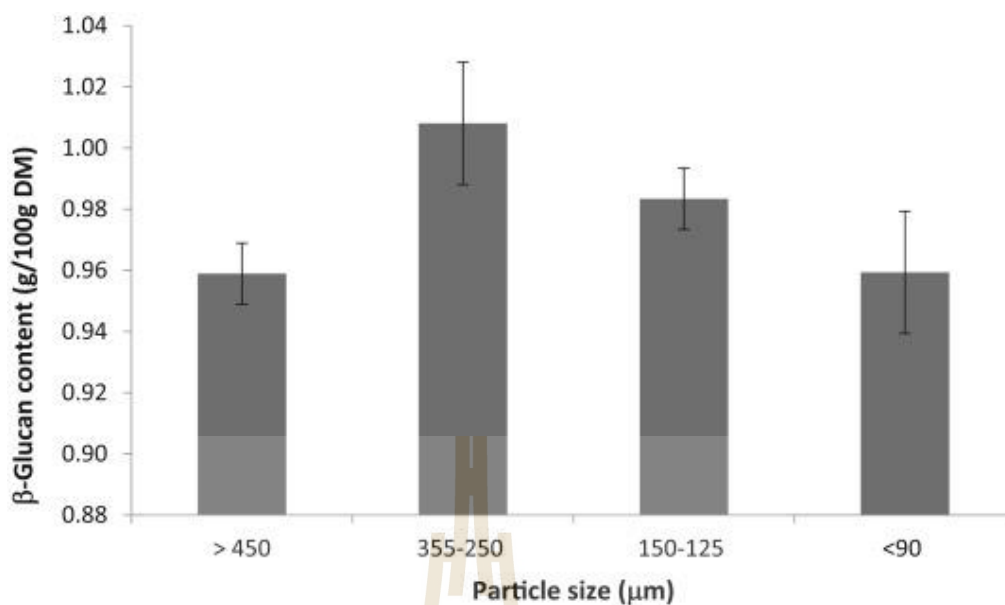
งานวิจัยของ Tian et al. (2012) ได้ทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) โดยใช้วิธี UAE ที่กำลังอุตราซาวด์ (160, 200, 240, และ 280 W) อุณหภูมิ (60, 65, 70, และ 75°C) เวลาสกัด (20, 40, 60, และ 80 min) อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อผงเห็ด (20, 25, 30, และ 35 mL/g) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือที่กำลังอุตราซาวด์ 230 W อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 62 min ใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อผงเห็ด 30 mL/g ได้พอลิแซ็กคาไรด์ 6.02%w/w

Smiderle et al. (2017) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) โดยใช้วิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ และของไหลความดันสูง เพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด ปัจจัยที่ใช้ในการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ (50, 115 และ 180 °C) เวลา (5, 17.5, และ 30 min) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดมีดังนี้ อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 30 และ 26 min (MAE และ PLE, ตามลำดับ) ของเห็ดนางรมได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 33.6% และ 40%, ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับการสกัดเห็ดหลินจือสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 27 และ 22 min ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 10.2% และ 10.5% (MAE และ PLE, ตามลำดับ) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า มีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเห็ดทั้ง 2 ชนิด โดยมีน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 86.5% น้ำตาลแมนโนส (4.9-9.4%) น้ำตาลกาแล็กโทส (1.1-3.5%) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนด้วยวิธี fluorescence พบว่าเห็ดนางรมและเห็ดหลินจือที่ถูกสกัดด้วยทั้ง 2 วิธี มีเบต้ากลูแคนชนิด (1 → 3), (1 → 6)- β -glucan 87 และ 97.3% (MAE และ PLE, ตามลำดับ) ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เห็ดหลินจือมีปริมาณเบต้ากลูแคนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ 60.7 และ 76% (MAE และ PLE, ตามลำดับ) ดังนั้นจากงานวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นว่าวิธีการสกัดที่ใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

การพิจารณาในกลุ่มที่ 3 เรื่องปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่มีผลช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการสกัดเบต้ากลูแคน จากที่กล่าวมาการสกัดมีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณค่าและปริมาณสารสกัดที่ได้ ค่าใช้จ่ายในการสกัด เป็นต้น งานทางด้านการศึกษาสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่มีผลต่อการสกัดดังนี้

พัตราพร จอมเมืองบุตร (2557) ได้สนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบต้ากลูแคนจากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ ปริมาตรน้ำ (100, 150, 200, 250, และ 300 mL/ ข้าวเหนียวดำ 20 g) ระยะเวลาการสกัด (1, 3, 5, และ 7 h) pH (4, 7, 10, และ 11) และอุณหภูมิ (35, 45, 55, และ 60°C) ผลการทดลองพบว่า pH (4 และ 7) และอุณหภูมิ (> 35°C) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบต้ากลูแคนมากกว่าปริมาตรน้ำและระยะเวลา จะได้ปริมาณสารสกัดและปริมาณเบต้ากลูแคนที่เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณเบต้ากลูแคนสกัดที่โดยใช้ น้ำ 150 mL พีเอช 7 อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 5 h ได้ปริมาณสูงสุดคือ 5.74 mg/100 g rice ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ตรวจพบ (1 → 3, 1 → 4)-Beta-glucotriose (G3) and (1 → 3, 1 → 4)-Beta-glucotetraose (G4) ในเบต้ากลูแคนจากข้าวเหนียวดำซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักในเบต้ากลูแคนจากธัญพืชงานวิจัยฉบับนี้ชี้ให้เห็นว่าเบต้ากลูแคนสามารถสกัดที่สภาวะกรดและกลางได้ดีกว่าสภาวะเบสแก่ดั่งนั้นในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่เลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดซึ่งมีสภาวะเป็นกลางหรือพีเอชเท่ากับ 7 ซึ่งเหมาะที่จะนำมาสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้มากถึง (soluble polysaccharide) 43% และมีเส้นใย (fiber) น้อยกว่า 7.6% (Bonatti, Karnopp, Soares, & Furlan, 2004)

Aguiló-Aguayo, Walton, Viñas, and Tiwari (2017) ได้ทำการศึกษาขนาดอนุภาคของผงเห็ดต่อปริมาณเบต้ากลูแคนจากเห็ดแชมปิญอง ที่มีขนาดตั้งแต่มากกว่า 450 μm , 355-250 μm , 150-125 μm และน้อยกว่า 90 μm พบว่าขนาดอนุภาค 355-250 μm และ 150-125 μm มีปริมาณเบต้ากลูแคนมากที่สุด คือ 1.01 และ 0.98 g/100 g DM ตามลำดับ ส่วนขนาดอนุภาคมากกว่า 450 μm น้อยกว่า 90 μm มีปริมาณเบต้ากลูแคน 0.96 g/100 g DM (รูปที่) จากผลดังกล่าว เป็นการบ่งชี้ว่าขนาดอนุภาคไม่มีผลต่อปริมาณของเบต้ากลูแคนในเห็ดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

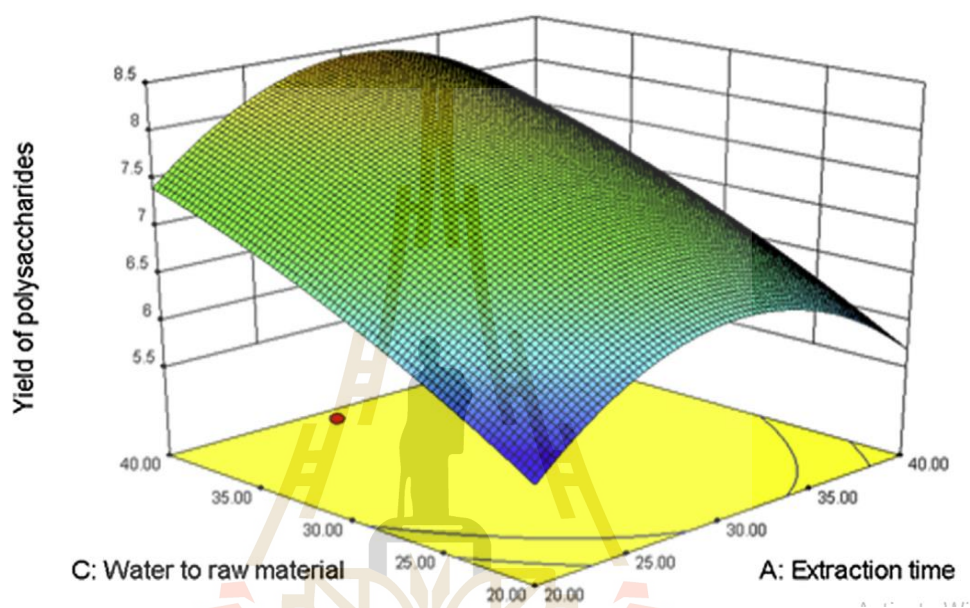


รูปที่ 2.8 β-Glucan content (g/100 g DM) of various fractions of mushroom by-product powder.
(Aguiló-Aguayo et al., 2017)

Su, Lai, and Ng (2017) ได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้จากเห็ดไมตาเกะ (*Grifola Frondosa*) ที่อุณหภูมิ 70, 100, และ 121°C เป็นเวลา 2 h อัตราส่วนน้ำต่อผงเห็ด 150 mL/3 g ผลการสกัดได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 2.61 ± 0.24 , 2.71 ± 0.24 , และ $3.35 \pm 0.16\%$, DW, ตามลำดับ ดังนั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้ได้รับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงขึ้นด้วย โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 121°C แตกต่างจาก 70 และ 100°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Smiderle et al. (2017) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) โดยใช้ MAE และ PLE ปัจจัยที่ใช้ในการสกัดคืออุณหภูมิและระยะเวลาที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ผลการศึกษาพบว่าเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงขึ้นจาก 50 เป็น 180°C พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเพิ่มเวลาการสกัดจาก 5 เป็น 30 min ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด โดยใช้วิธี MAE และ PLE

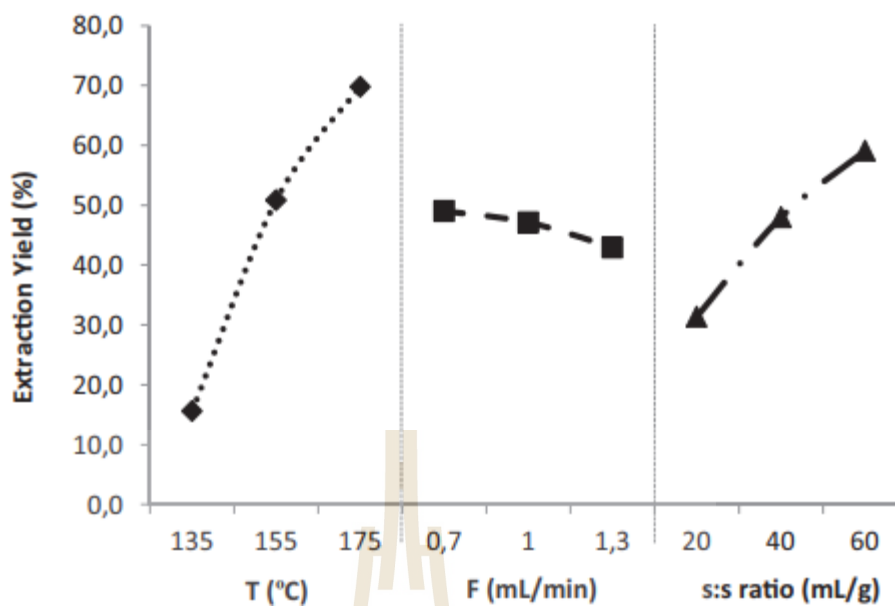
Chen, Shao, Tao, and Wen (2015) ได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Armillaria luteo-virens* (Alb. et Schw. Fr.) Sacc. ด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ เพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด ปัจจัยที่ใช้ในการสกัดได้แก่ กำลังไมโครเวฟ (500, 600, และ 700 W) เวลาที่ใช้ในการสกัด (20, 30, และ 40 min) และอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อผงเห็ด (20, 30, และ 40 mL/g) พบว่าสภาวะ

ที่เหมาะสมในการสกัดคือกำลังไมโครเวฟ 600.6 W ใช้เวลา 30.24 min และอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อผงเห็ด 40 mL/g และได้รับพอลิแซ็กคาไรด์จากการทดลองคือ $8.40 \pm 0.12\%$ รูปที่ 2.9 เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อผงเห็ดส่งผลให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดไปในระดับหนึ่งปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะค่อยๆเพิ่มขึ้น แล้วหลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงเมื่อใช้เวลาในการสกัดที่นานเกินไป



รูปที่ 2.9 The response surface plots of the effect of extraction time and water to raw material ratio and their reciprocal interaction on polysaccharide yield (%). (Chen et al., 2015)

Benito-Román, Alonso, Cocero, and Goto (2016) ทำการสกัด (1→3, 1→6)-β-D-glucan จากเห็ดหลินจือ ด้วยเทคนิค pressurized hot water as solvent (P=5 MPa) ที่อุณหภูมิ (T) 135-175°C อัตราการไหล (F) 0.7-1.3 mL/min และอัตราส่วนตัวทำละลายต่อผงเห็ด (s:s ratio) 20-60 mL/g ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 2.10 ซึ่งแสดงกราฟของปัจจัยที่ระดับต่างๆต่อปริมาณสารสกัด เห็นได้อย่างชัดเจนว่าอัตราการไหลไม่มีผลต่อปริมาณสารสกัด แต่ส่วนใหญ่ได้รับผลจากอุณหภูมิการสกัด และตัวทำละลายต่ออัตราส่วนที่เป็นของแข็ง มีแนวโน้มเดียวกันคือ อุณหภูมิยิ่งสูงยิ่งได้ผลผลิตสกัดสูง และปริมาณของตัวทำละลายที่สูงขึ้นเมื่อผ่านเห็ดยิ่งทำให้ปริมาณการสกัดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน



รูปที่ 2.10 Main effects diagram for the extraction yield of β -glucans from *Ganoderma lucidum*.

Effect of temperature (◆), flow rate (■) and solvent to solid ratio (▲) on extraction yield. (Benito-Román et al., 2016)

จากการที่ได้ทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาซึ่งเกี่ยวข้องกับการสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จากเห็ดเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*) ด้วยคลื่นไมโครเวฟ (MAE) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน ใช้พลังงานน้อยและมีประสิทธิภาพสูง และยังสามารถให้อุณหภูมิสูงในการสกัดได้ โดยใช้อัตราส่วนผงเห็ดต่อน้ำ 1:60; w/v ปัจจัยที่ใช้ในการสกัดได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในบทนี้กล่าวถึงรายละเอียดของตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิจัย วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคลื่นไมโครเวฟ รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือซึ่งประกอบด้วยชื่อเครื่องมือ รุ่น และเงื่อนไขของการใช้งาน (conditions of equipment) โดยได้อธิบายดังต่อไปนี้

3.1 ผลของระยะเวลาการสกัดหือต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Effect of extraction time on polysaccharides yield)

ในหัวข้อนี้ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับระยะเวลาที่มีผลต่อการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน ด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด 120°C ระยะเวลาสกัด 3 ระดับคือ 15, 30, และ 45 min แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างระดับจุลภาค โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1.1 วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ (Mushroom powder preparation)

เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.) ที่ถูกใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาครั้งนี้ซื้อจากตลาดสดเพชรสิมา อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เห็ดนางฟ้าภูฐานสดถูกนำมาเตรียมก่อนนำไปสกัด โดยล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น (deionized water) จากนั้นนำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จนกระทั่งมีความชื้นประมาณ 5% (มาตรฐานแห้ง) และนำไปบดลดขนาดด้วยเครื่องบดละเอียด (Cross beater mill) (Pulverisette 16, Fritsch, Germany) ให้เป็นผงที่มีขนาดเล็กกว่า 250 μm (Aguiló-Aguayo et al., 2017) จากนั้นนำผงเห็ด (native-MR) ไปบรรจุในถุงพลาสติกสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อควบคุมคุณภาพของผงเห็ดและรอการทดสอบต่อไป โดยขั้นตอนการเตรียมผงเห็ดแสดงดังรูปที่ 3.1

3.1.2 การสกัดด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave extraction; AE)

เติมผงเห็ดนางฟ้าภูฐาน (native-MR) 0.25 g ลงในหลอดเซนติฟิวก์พลาสติก (centrifuge tube) ที่มีขนาด 50 mL เติมน้ำกลั่น 15 mL (1:60, w/v) นำไปสกัดด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วย

แรงดันไอน้ำ (SX-700, TOMY, Tokyo, Japan) (รูปที่ 3.2 B) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min หลังจากสกัดเสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นลง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกสารสกัด (supernatant) ออกจากส่วนตกค้าง (residue) จากนั้นนำสารสกัดมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนเอทานอลต่อสารสกัด 3:1; v/v นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 h แล้วนำตะกอนที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำตะกอนออกมาทำให้แห้งด้วยวิธีแบบแช่เยือกแข็งเช่นเดียวกับส่วนตกค้าง เพื่อคำนวณหาปริมาณส่วนตกค้าง (AE-residue) และปริมาณที่ตกตะกอนได้ (AE-precipitate) ดังสมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมผงเห็ด (native-MR): (A) เห็ดนางฟ้าภูฐานสด (B) เห็ดถูกหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ (C) เห็ดหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (D) ผงเห็ดหลังถูกบด (E) ผงเห็ดบรรจุในถุงพลาสติกสุญญากาศ

3.1.3 การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction; MAE)

ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคลื่นไมโครเวฟโดยดัดแปลงวิธีการสกัดจาก Smiderle et al. (2017) ชั่ง native-MR 0.25 g ลงในหลอดไมโครเวฟเติมน้ำกลั่น 15 ml (อัตราส่วน

ผงเห็ดต่อน้ำ 1: 60, w/v) ใส่ถังแม่เหล็กกวนสารขนาดเล็ก แล้วนำไปสกัดโดยใช้เครื่องไมโครเวฟรุ่น Multiwave 3000 SOLV (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) (รูปที่ 3.2 A) โดยใช้กำลังแมกนีตรอนสูงสุดที่ 1200 W ความดัน 1.5 MPa ความถี่ 2,455 MHz ในระหว่างการสกัด ตัวอย่างถูกกวนด้วยถังแม่เหล็กกวนสารที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 120°C ใช้เวลาในการสกัดนาน 15, 30 และ 45 min หลังจากการสกัดรอให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิลดลงเหลือ 45°C แล้วนำสารสกัดหรือส่วนใส (supernatant or extract) มาแยกออกจากกากผงเห็ดที่เหลือหรือเรียกว่าส่วนตกค้าง (residue) ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 min แล้วเติมเอทานอล 95% ลงในสารสกัดในอัตราส่วนเอทานอลต่อสารสกัด 3:1; v/v ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 h เพื่อให้เกิดการตกตะกอน (precipitation) ของพอลิแซ็กคาไรด์ แล้วแยกตะกอนออกจากเอทานอลโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm นาน 10 min ที่ 4°C นำส่วนตกตะกอน (precipitate) มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำไปคำนวณปริมาณที่ตกตะกอน (MAE-precipitate) ได้ดังสมการที่ 3.2 ส่วนตกค้างนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำมาคำนวณปริมาณส่วนตกค้าง (MAE-residue) ดังสมการที่ 3.1

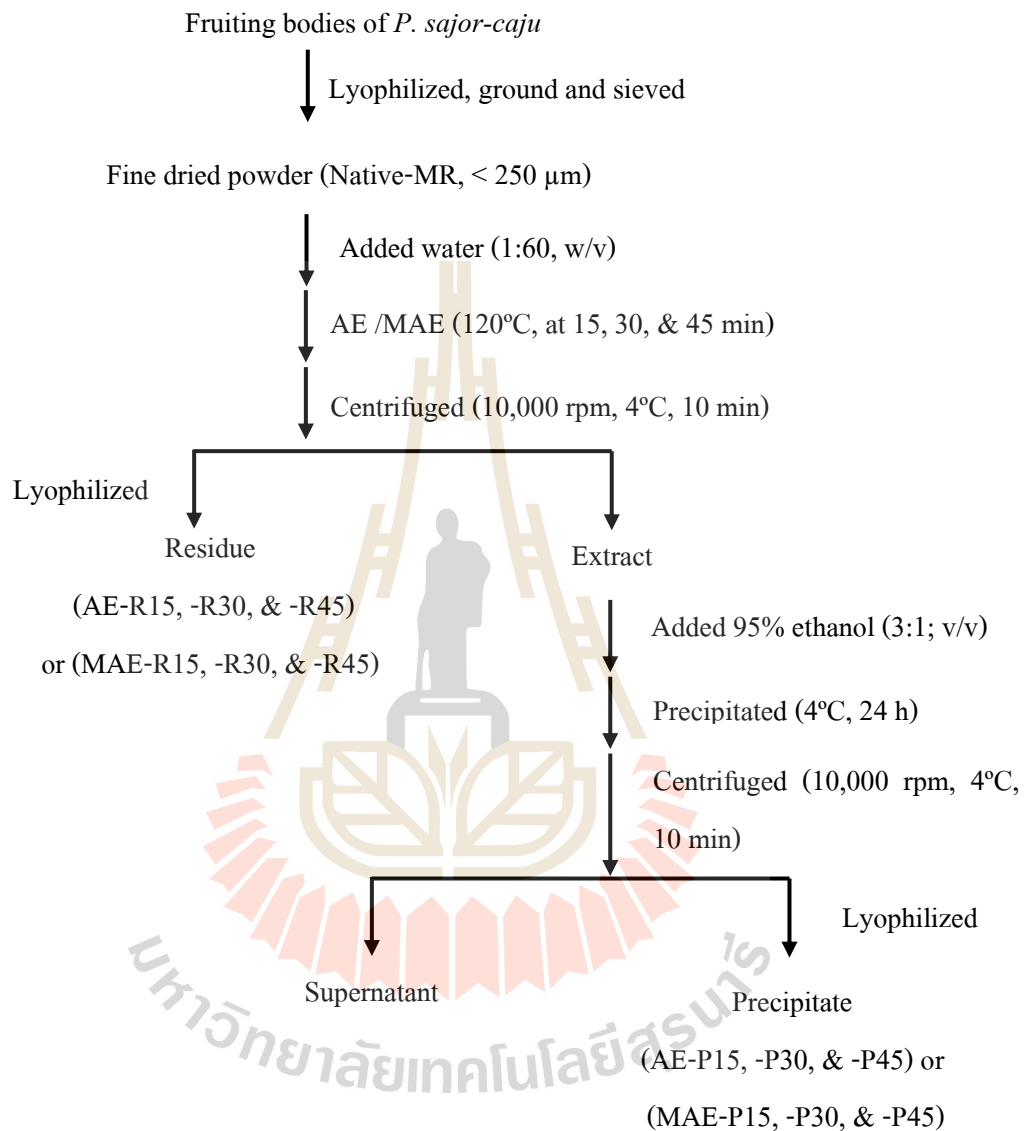
$$\text{Yield of residue (\%)} = \frac{\text{weight of residue after extraction (g)}}{\text{weight of the mushroom powder (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Yield of precipitate (\%)} = \frac{\text{weight of precipitate after recovered from the extract (g)}}{\text{weight of the mushroom powder (g)}} \times 100 \quad (3.2)$$



รูปที่ 3.2 เครื่องที่ใช้ในการสกัดเบต้ากลูแคน: (A) เครื่องไมโครเวฟ รุ่น Multiwave 3000 SOLV (B) หม้อปั่นมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ

แผนผังแสดงขั้นตอนวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้คลื่นไมโครเวฟและหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ แสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ผังการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) หรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) จากเห็ดนางฟ้าภูฐานที่อุณหภูมิ 120°C เวลา 15-45 min

3.1.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture) โปรตีน (crude protein), ไขมัน (crude fat), เถ้า (ash), และปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ในตัวอย่าง native-MR, residue (-R15, -R30, -R45) และ precipitates (-P15, -P30, -P45) ของการสกัดทั้งสองวิธี (AE และ MAE) สกัดที่ 120°C การวิเคราะห์ใช้วิธีตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists methods (AOAC, 2000)

ปริมาณความชื้น หาได้โดยการนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105°C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่แล้วจึงคำนวณหาปริมาณความชื้นตามสมการที่ 3.3

$$\text{Moisture content (\% wet basis; wb)} = \frac{\text{wet weight} - \text{weight after dry}}{\text{wet weight}} \times 100 \quad (3.3)$$

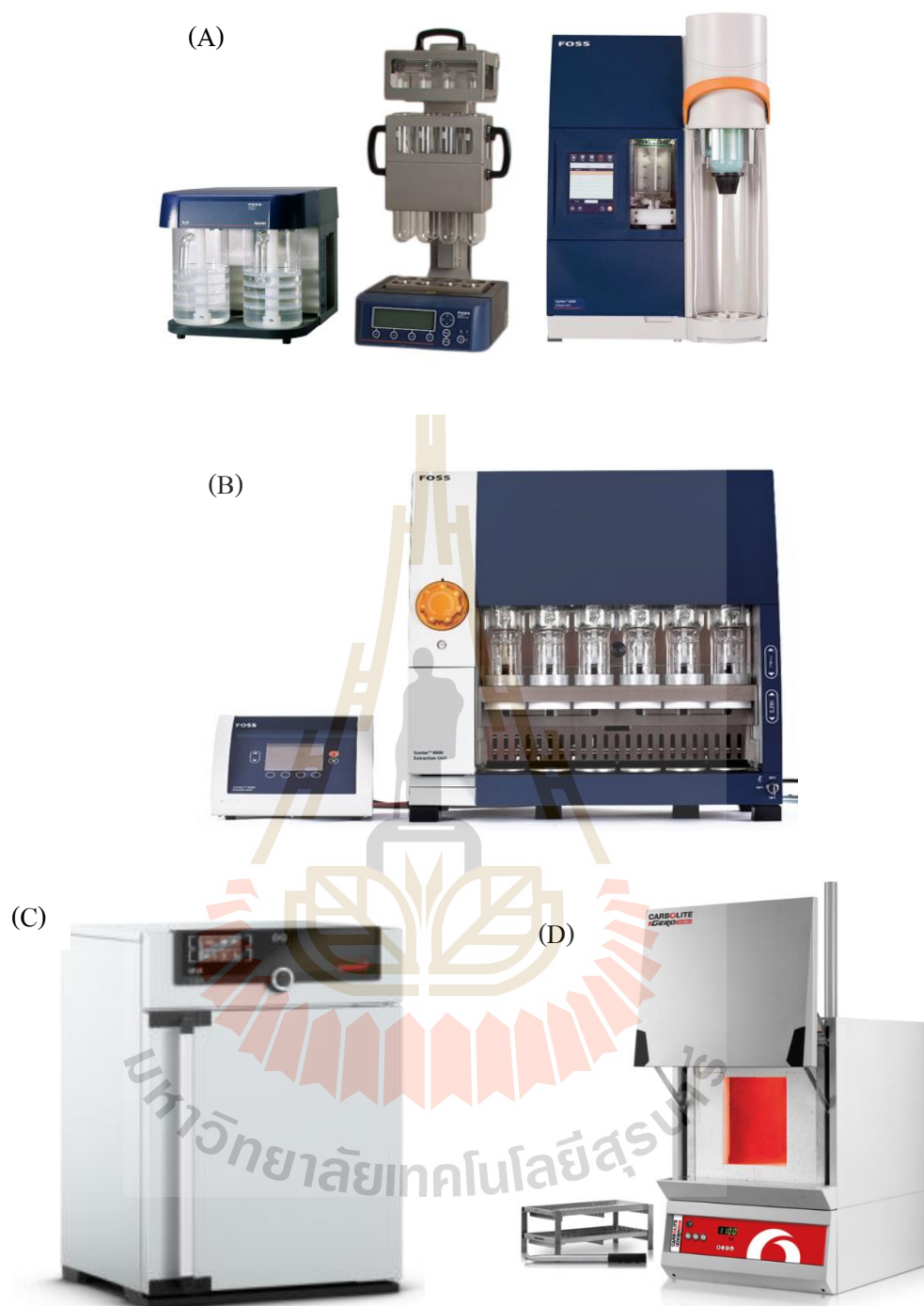
ปริมาณโปรตีนถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีคเจดาห์ล (Kjeldahl method) โดยนำตัวอย่างมาย่อยด้วยเครื่องย่อยสารแบบอัตโนมัติ (Digester™ 2508, Foss, Denmark) แล้วนำมากลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจนแบบอัตโนมัติ (Kjeltec™ 8400, Foss, Denmark) (รูปที่ 3.4 A) เพื่อหาปริมาณไนโตรเจน แพลกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับผลิตภัณฑ์จากเห็ดเท่ากับ 4.38 ปริมาณไขมันสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ไขมันแบบอัตโนมัติ (Soxtec™ 8000, Foss, Denmark) (รูปที่ 3.4 B) ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) เป็นตัวทำละลายสารสกัดสำหรับปริมาณเถ้าถูกวิเคราะห์โดยการนำตัวอย่างไปเผาในเตาเผา (รูปที่ 3.4 D) ที่อุณหภูมิสูง 550°C จนกระทั่งตัวอย่างไม่มีส่วนที่เป็นสีดำเหลืออยู่ ปริมาณเถ้าสามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 3.4

$$\text{Ash (\%, db)} = \frac{\text{weight of the ash sample}}{\text{weight of dried sample}} \times 100 \quad (3.4)$$

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและพลังงานสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.5 และ 3.6 ตามลำดับ (Heleno et al., 2015; Finimundy et al., 2018)

$$\text{Total carbohydrates (\%, db)} = 100 - \text{protein content (\%)} - \text{fat content (\%)} - \text{ash (\%)} \quad (3.5)$$

$$\text{Energy (kcal/100 g)} = (4 \times \text{g protein}) + (4 \times \text{g carbohydrates}) + (9 \times \text{g fat}) \quad (3.6)$$



รูปที่ 3.4 เครื่องที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี: (A) เครื่องย่อยสารและกลั่นไนโตรเจนแบบอัตโนมัติ (B) เครื่องวิเคราะห์ไขมันแบบอัตโนมัติ (C) ตู้อบลมร้อน และ (D) เตาเผาอุณหภูมิสูง

3.1.5 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค (Scanning electron microscopy; SEM)

วิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) รุ่น JSM 6010LV (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) ดังรูปที่ 3.5 โดยนำตัวอย่างผง native-MR, AE-R15, -R30, -R45 และ MAE-R15, -R30, -R45 มาเคลือบด้วยทองก่อนนำเข้าเครื่อง SEM ใช้โหมดแสง SEI ระดับพลังงาน 10 kV และระดับกำลังขยายของภาพเท่ากับ 1200 เท่า เพื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐานที่เปลี่ยนแปลงไปตามวิธีการและเวลาที่ใช้ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์



รูปที่ 3.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.2 ผลของอุณหภูมิการสกัดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Effect of extraction temperature on polysaccharides yield)

การศึกษาระยะเวลาที่มีผลต่อการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน ฟาร์มเห็ดละลมโพธิ์ ด้วยวิธีการใช้คลื่นไมโครเวฟ และการสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำอุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C ที่ระยะเวลา 5, 10, และ 15 min แล้วนำผลที่เหมาะสมในการสกัดมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ มีรายละเอียดการทดลองดังนี้

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ (Mushroom powder preparation)

นำเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ซื้อจากฟาร์มเห็ดละลมโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำเห็ดไปบดเป็นผงด้วยเครื่องบดละเอียด (Cross beater mill) (Pulverisette 16, Fritsch, Germany) ให้มีขนาดเล็กกว่า 250 μm (Aguiló-Aguayo et al., 2017) จากนั้นนำผงเห็ด (native-MR) ไปบรรจุสุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C รอการทดสอบต่อไป

3.2.2 การสกัดด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave extraction, AE)

วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ มีขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.1.3 โดยนำ native-MR 0.25 g ใส่ลงในหลอดเซนต์ปีทริกพลาสติก ผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:60, w/v แล้วนำไปให้ความร้อนในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (SX-700, TOMY, Tokyo, Japan) (รูปที่ 3.2 B) ที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C นาน 5, 10, และ 15 min หลังจากนั้นนำสารสกัดไปตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 3:1; v/v ที่ทิ้งไว้ 24 h ที่อุณหภูมิ 4°C นำตะกอนที่ได้มาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min อุณหภูมิ 4°C แล้วนำตะกอนและส่วนตกค้างมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำส่วนตกค้าง และตะกอนที่แห้งแล้วมาคำนวณหาปริมาณส่วนตกค้าง (AE-residue) และปริมาณที่ตกตะกอนได้ (AE-precipitate) ดังในสมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

3.2.3 การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave-Assisted Extraction; MAE)

วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้คลื่นไมโครเวฟ มีขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 โดยเติม native-MR 0.25 g ลงในหลอดไมโครเวฟเติมน้ำกลั่น 15 ml (อัตราส่วนผงเห็ดต่อ น้ำ 1: 60, w/v) นำไปสกัดด้วยเครื่องไมโครเวฟ (Multiwave 3000 SOLV, Anton Paar GmbH, Graz, Austria) (รูปที่ 3.2 A) ที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min ในระหว่างสกัดตัวอย่างถูกคนด้วยความเร็วรอบ 200 rpm เสร็จแล้วแยกสารสกัดออกจากส่วนตกค้าง เติมเอทานอล 95% ลงในสารสกัด (3:1; v/v) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 h เกิดการตกตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ ดังรูปที่ 3.6 แยกส่วนที่ตกตะกอนออกจากเอทานอล แล้วนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ปริมาณส่วนตกค้าง (MAE-residue) และปริมาณที่ตกตะกอน (MAE-precipitate) สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ



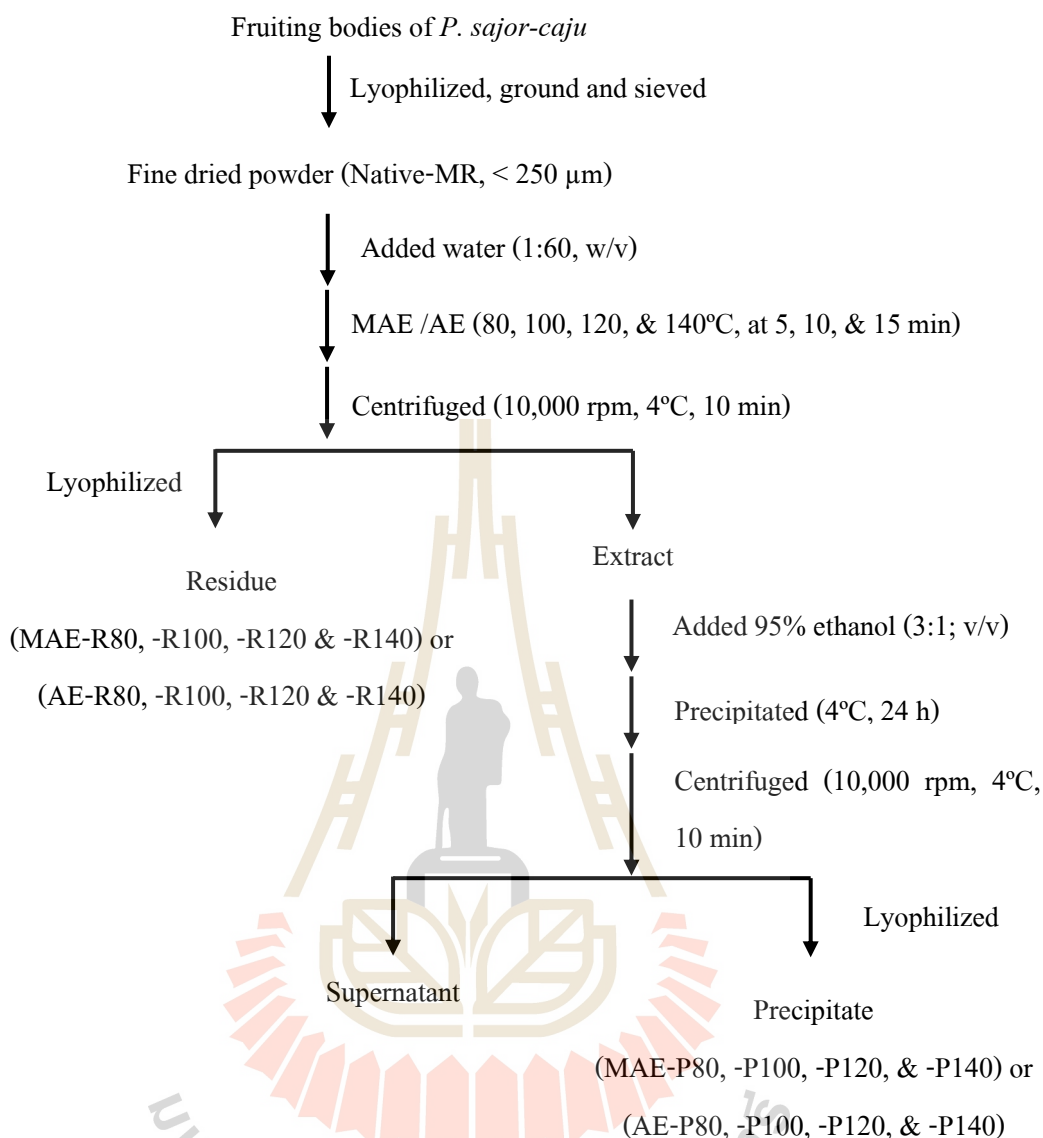
รูปที่ 3.6 การตกตะกอน (precipitation) ของพอลิแซ็กคาไรด์ หลังเติมเอทานอล 95% ลงในสารสกัด (3:1; v/v)

แผนผังแสดงขั้นตอนวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์โดยใช้คลื่นไมโครเวฟและหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 3.2.2 และ 3.2.3 แสดงดังรูปที่ 3.7

จากผลการทดสอบพบว่าวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ (MAE) มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการสกัดด้วยวิธี AE และเวลาที่ใช้ในการสกัด (5, 10, และ 15 min) ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของส่วนตกตะกอน (พอลิแซ็กคาไรด์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกวิธีการสกัดแบบ MAE เป็นเวลา 5 min เพื่อสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน นำส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอนที่ได้มาวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพดังต่อไปนี้

3.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยทำเช่นเดียวกับข้อที่ 3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture) โปรตีน (crude protein), ไขมัน (crude lipid), เถ้า (ash), และปริมาณคาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ในตัวอย่าง native-MR, MAE-residues, และ MAE-precipitates ถูกสกัดที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C เป็นเวลา 5 min ถูกเขียนแทนด้วย MAE-R80, -R100, -R120, R140 และ MAE-P80, -P100, -P120, และ -P140, ตามลำดับ การวิเคราะห์ใช้วิธีตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists methods (AOAC, 2000)



รูปที่ 3.7 ฟังการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) หรือหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) จากเห็ดนางฟ้าภูฐานที่อุณหภูมิ 80-140°C เวลา 5-15 min

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารเบต้ากลูแคน (β -glucan content analysis)

ปริมาณสารเบต้ากลูแคนของ native-MR, MAE-R80-R140, MAE-P80-P140 และตัวอย่างเบต้ากลูแคนที่ได้มาพร้อมกับชุดทดสอบวิเคราะห์เบต้ากลูแคนจาก Megazyme (C- β -glucan) ถูกวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบ Mushroom and yeast beta glucan assay kit (Megazyme International, Wicklow, Ireland) มีหลักการคือหาปริมาณสารกลูแคนทั้งหมด (Total glucan) ประกอบด้วย α -Glucan และ β -Glucan linkages แล้วนำไปหักออกด้วยปริมาณของ α -Glucan อาศัย

หลักการที่สาย (1→3,1→6)-β-D-glucan, (1→3)-β-glucans และ α glucans ถูกละลายในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (12 M H₂SO₄) หลังจากนั้นพันธะจะถูกตัดด้วย 2 M H₂SO₄ ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 h แล้วนำมาบ่มร่วมกับเอนไซม์ exo-1,3-β-glucanase และ β-glucosidase เพื่อให้ได้เป็น D-glucose โดยสมบรูณ์สำหรับหลักการวิเคราะห์ปริมาณสารกลูแคนทั้งหมด ส่วน α-Glucans จะถูกย่อยให้เป็น glucose ด้วย amyloglucosidase + α-amylase ใช้ GOPOD reagent วัดปริมาณกลูโคส (glucose) ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.2.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูแคนทั้งหมด (Total glucan)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบด (< 1.0 mm) 90 mg ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL เติมกรดซัลฟิวริก (12 M) 2.0 mL ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) แล้วนำไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีน้ำเย็นจัดนาน 2 h (ในระหว่างนี้ให้นำหลอดขึ้นมาเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลายทุก ๆ 10 min) เติมน้ำกลั่น 10 mL ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C โดยก่อนต้มให้คลายเกลียวฝาหลอด และหลังจากต้มผ่านไป 5 min ให้ปิดฝาหลอดให้แน่น แล้วต้มต่อไปเป็นเวลา 2 h หลังจากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆคลายเกลียวออก ถ่ายตัวอย่างทั้งหมดในหลอดลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL ใช้ 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่กับหลอดทดลอง เติม KOH 10 M ปริมาตร 6 mL แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL ด้วย 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g (3000 rpm) เป็นเวลา 10 min โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ปิเปตสารละลายใส 0.1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมเอนไซม์ผสมระหว่าง exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) และ β-glucosidase (4 U/mL) ที่ถูกละลายใน 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ลงในหลอด เขย่าทันทีและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C นาน 60 min เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 mL บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C เป็นเวลา 20 min วัดค่าการดูดกลืนแสง (ΔE) ของสารละลายในหลอดด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer (Hitachi U-2900 UV-VIS, Biochrom, Japan) (รูปที่ 3.9 A) ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (nm) โดยเทียบกับ reagent blank ประกอบด้วย 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.2 mL กับ GOPOD Reagent 3.0 mL และคำนวณปริมาณกลูแคนทั้งหมดได้จากสูตรที่ 3.7

$$\text{Total Glucan (\%w/w)} = \Delta E \times F/W \times 90 \quad (3.7)$$

โดยที่ ΔE คือ ค่าการดูดกลืนแสง

F คือ แฟกเตอร์สำหรับเปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงไปเป็น μg ของ D-glucose

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

3.2.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาไกลูแคน (α -Glucan)

ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านการบด 100 mg ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 mL ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารลงในหลอด แล้วเติม 2 M KOH 2.0 mL และนำไปตั้งบนเครื่องกวนสารละลาย (Magnetic Stirrer) กวนประมาณ 20 min ภายใต้สภาวะที่เย็นจัด เติม 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL ลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติมเอนไซม์ amyloglucosidase (1630 U/mL) ซึ่งผสมกับ invertase (500 U/mL) ปริมาตร 0.2 mL ทันที เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสมสารละลาย แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C นาน 30 min ระหว่างนั้นให้นำหลอดทดลองออกมาเขย่าเป็นระยะๆ

(สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ α -glucan > 10%) ถ่ายสารละลายที่นำออกมาจากอ่างควบคุมอุณหภูมิลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL ล้างหลอดและแท่งแม่เหล็กกวนสารด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 mL ด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 10 min หรือกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1

(สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ α -glucan < 10%) นำสารละลายออกจากอ่างควบคุมอุณหภูมิไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 10 min (ไม่ต้องทำการเจือจางสารละลาย) โดยปริมาตรสุดท้ายจะเป็น 10.3 mL

ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้มา 0.1 mL ใส่ในหลอดทดลอง เติม sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.0) ปริมาตร 0.1 mL เติม GOPOD reagent ปริมาตร 3 mL บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C เป็นเวลา 20 min วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในหลอดด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 nm เทียบกับ reagent blank โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณแอลฟาไกลูแคนจากสูตรที่ 3.9 เนื่องจากโดยปกติแล้วแอลฟาไกลูแคนจากเห็ดจะมีปริมาณไม่เกิน 10% หรือสามารถดูได้จากค่าการดูดกลืนแสง ปริมาณ β -glucan คำนวณได้จากสูตรคำนวณที่ 3.10

$$\alpha\text{-Glucan (\%w/w) (\alpha-glucan > 10\%)} = \Delta E \times F/W \times 90 \quad (3.8)$$

$$\alpha\text{-Glucan (\%w/w) (\alpha-glucan < 10\%)} = \Delta E \times F/W \times 9.27 \quad (3.9)$$

$$\beta\text{-Glucan (\%w/w)} = \text{Total Glucan (\%w/w)} - \alpha\text{-glucan (\%w/w)} \quad (3.10)$$

โดยที่ ΔE คือ ค่าการดูดกลืนแสง

F คือ แฟกเตอร์สำหรับเปลี่ยนค่าดูดกลืนแสงไปเป็น μg ของ D-glucose

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (g)

3.2.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant properties)

3.2.6.1 การเตรียมสารสกัด (Sample preparation)

นำผงตัวอย่าง native-MR, MAE-R80-R140, MAE-P80-P140, และ C- β -glucan 100 mg เติมเมทานอล (methanol) จำนวน 2 ml แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลาด้วยความเร็ว 320 rpm ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 h ด้วยเครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker, KS 4000 i control, IKA, Germany) (รูปที่ 3.8) แยกส่วนใส (extracts) ออกจากกากโดยกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 นำสารสกัดที่ได้เก็บในตู้แช่แข็ง -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Heleno et al., 2015)

3.2.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content assay)

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงจากวิธีของ Heleno et al. (2015) โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.2 mL ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 2 mL ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 min จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20.0% ปริมาตร 0.6 mL ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 min นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 g (mg gallic acid/g sample, db) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.8 เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

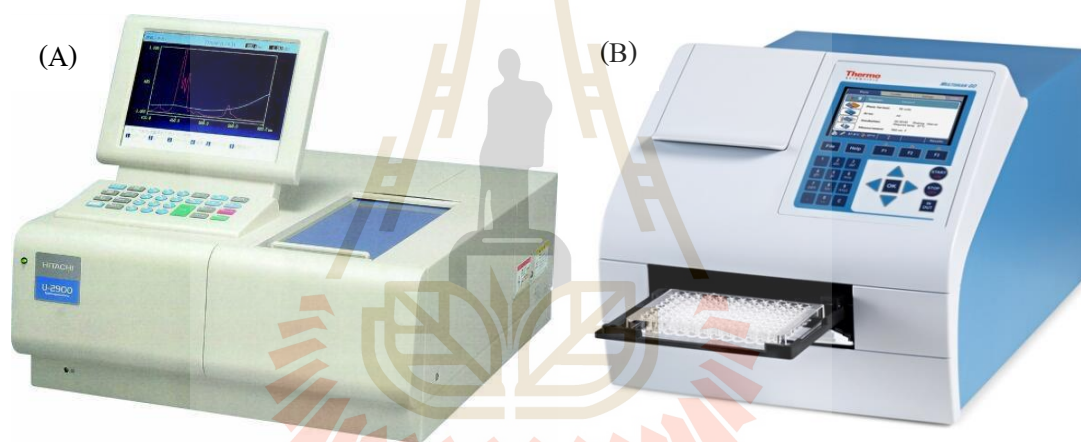
3.2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging activity assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยปรับปรุงจากวิธีการของ Heleno et al. (2015) เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH reagent) โดยชั่งดีพีพีเอช 24.0 mg ละลายในเมทานอล 100 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อนำมาใช้งานเจือจางสารละลายที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.10 ± 0.06 ที่ความยาวคลื่น 515 nm ทำการทดสอบโดยผสมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (Trolox, BHA, และ BHT ความเข้มข้น 5, 20, 25, และ 50 mg/L) 75 μ L ผสมกับสารละลายดีพีพีเอช 200 μ L ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้เครื่อง Microplate Spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific™, U.S.) (รูปที่ 3.9 B) เปรียบกับ blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณจากกราฟสารละลายมาตรฐาน ในหน่วยของ ไมโครโมลสมมูลของ Trolox, BHA, และ BHT ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 g (μ mol Trolox, BHA, and BHT/ g sample, db) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.2.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ดัดแปลงวิธีการจาก Adebayo et al. (2018) เป็นการทดสอบโดยใช้สารละลาย ABTS^{•+} reagent โดยเตรียมสารละลายเอบีทีเอสในน้ำกลั่นความเข้มข้น 7

mM ปริมาณ 15 mL ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 140 mM 264 μ L แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 h ก่อนนำไปใช้ ให้เจือจางสารละลาย ABTS⁺ reagent ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.70 ± 0.02 ทำการทดสอบโดยผสมสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (Trolox, BHA, และ BHT ความเข้มข้น 5, 20, 25, และ 50 mg/L) 0.2 mL กับผสมสารละลาย ABTS⁺ reagent 2 mL ตั้งทิ้งไว้ที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 min แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer เปรียบกับ blank วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณจากกราฟสารละลายมาตรฐาน ในหน่วยของ ไมโครโมลสมมูลของ Trolox, BHA, และ BHT ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 g (μ mol Trolox, BHA, and BHT/ g sample, db)



รูปที่ 3.9 (A) เครื่อง UV-spectrophotometer (B) เครื่อง microplate spectrophotometer

3.2.7 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค (Scanning electron microscopy; SEM)

นำตัวอย่างผง native-MR, AE-residue 120°C สกัดที่เวลา 5 min (เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการสกัดไม่มีผลต่อปริมาณส่วนตกตะกอน) (AE-R120), MAE-R80-R140, MAE-P80-P140, และ C- β -glucan มาวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) รุ่น JSM 6010LV (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) (รูปที่ 3.5) โดยนำตัวอย่างมาเคลือบด้วยทองคำก่อนนำเข้าเครื่อง SEM ใช้โหมดแสง SEI ระดับพลังงาน 10 kV และระดับกำลังขยายของภาพเท่ากับ 1200 เท่า เพื่อตรวจสอบโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปตามวิธีการและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด



รูปที่ 3.10 วิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.2.8 การวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของสารโดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด (FTIR characterization)

ตัวอย่าง Native-MR, MAE-P80-P140, และ C- β -glucan ถูกนำมาบดเป็นผงละเอียดแล้วนำมาวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ทางองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของสารโดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด (fourier transform infrared spectroscopy; FTIR) รุ่น Tensor 27 (Bruker optic GmbH, USA) (รูปที่ 3.11) ด้วยโปรแกรม OPUS version 7.0 ที่ความยาวคลื่น 4000-400 cm^{-1} , resolution 4 cm^{-1} จำนวนสแกน 64 รอบ/ครั้ง โดยอ้างอิงกับอากาศ วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.2.9 การวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR spectral analysis)

ตัวอย่างผง Native-MR, MAE-P80-P140 ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกตรัม ^{13}C NMR ที่ความถี่ 125.8 MHz โดยใช้เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ขนาด 500 MHz (nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR) (AVANCE III HD, Bruker, Germany) (รูปที่ 3.12) ตัวอย่าง 10 mg ถูกละลายใน DMSO-d_6 500 μL ที่อุณหภูมิ 70°C จะได้ผลของสเปกตรัม NMR มีลักษณะเป็นพีก โดยมีแกนนอน (x-axis) เป็นค่า chemical shift (δ) ซึ่ง δ มีค่าเท่ากับความถี่ของการเกิดเรโซแนนซ์หารด้วยความถี่ของสนามแม่เหล็กภายนอก คูณด้วย 10^6 หรือ (ppm) ในการวิจัยนี้ ^{13}C NMR ของ Native-MR ไม่ได้ถูกวิเคราะห์เนื่องจากไม่สามารถละลายใน DMSO-d_6



รูปที่ 3.11 เครื่อง fourier transform infrared spectroscopy (FTIR รุ่น Tensor 27)



รูปที่ 3.12 เครื่องวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

3.2.10 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy; AFM)

สารละลายตัวอย่างถูกเตรียมตามวิธีการของ Wang et al. (2018) Native-MR และ MAE-P80-P140 ถูกละลายในน้ำกลั่น โดยกวนที่ความเร็วรอบ 320 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา

48 h แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman paper no. 1 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 0.01 g/mL สารละลายถูกนำมาเจือจางให้เหลือความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นกระจกสไลด์ ที่งไว้ให้แห้งแล้วจึงนำตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาพื้นผิวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแรงอะตอม (atomic force microscopy; AFM) (AFM, XE-120, Park system, Korea) (รูปที่ 3.13) ในโหมดการทำงานแบบไม่สัมผัส (non-contact (NC) mode) โดยใช้คานยื่น (cantilever) ที่มีเข็มขนาดเล็กซึ่งทำมาจากซิลิกอน (ACTA, AppNano, USA) อัตราในการสแกนเท่ากับ 0.3 Hz ความละเอียด 256 x 256 pixels



รูปที่ 3.13 กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope)

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical analysis)

3.3.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อผลของระยะเวลาการสกัดหีตต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

ในงานวิจัยจะใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียลแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Factorial Design, CRFD) การทดลองถูกวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ และผลลัพธ์ที่ได้แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (two-way ANOVA) เพื่อประเมินผลของวิธีการสกัดและเวลาการสกัด และวิเคราะห์ห้อิทธิพลร่วม

ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณส่วนตกค้างและองค์ประกอบทางเคมี ส่วนตกตะกอนและองค์ประกอบทางเคมี โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี tukey's honestly significant different (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม minitab[®] 17 (Minitab Inc., USA)

3.3.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติต่อผลของอุณหภูมิการสกัดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

ในงานวิจัยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ถูกวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ และผลลัพธ์ที่ได้แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เพื่อประเมินประสิทธิภาพการสกัดสำหรับวิธี AE และ MAE ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ที่มีผลต่อปริมาณส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน และประเมินอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดของวิธี MAE ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารเบต้ากลูแคน และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี tukey's honestly significant different (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม minitab[®] 17 (Minitab Inc., USA)

บทที่ 4

ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ผล

ในบทนี้จะนำเสนอผลการศึกษาศักยภาพการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคลื่นไมโครเวฟจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน ผลของวิธีสกัดผลต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของส่วนตกค้าง (residue) และส่วนตกตะกอน (precipitate) โดยแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน คือ ผลของระยะเวลาการสกัดเห็นต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และผลของอุณหภูมิการสกัดเห็นต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยได้อธิบายดังต่อไปนี้

4.1 ผลของระยะเวลาการสกัดเห็นต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Effect of extraction time on polysaccharides yield)

4.1.1 ผลของวิธีการสกัดด้วยหม้อหนึ่งหม้อเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำและคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน (Effects of AE and MAE on the residue and precipitate yields of *P. sajor-caju*)

การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยหม้อหนึ่งหม้อเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) และคลื่นไมโครเวฟ (MAE) โดยใช้ผงเห็ดอัตราส่วน 1 g ต่อน้ำ distilled water (DI) 60 mL อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min หลังจากการสกัดได้นำส่วนของสารสกัด (extract) มาเติมด้วยเอทานอลเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของสารพอลิแซ็กคาไรด์ (Smiderle et al., 2006) ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า ส่วนตกตะกอน (precipitate) แสดงผลในตารางที่ 4.1 รวมทั้งปริมาณของส่วนตกค้าง (residue) แสดงค่าในรูปร้อยละ โดยน้ำหนักผงแห้งของเห็ด (% db) จากผลการทดลองพบว่าค่าปริมาณร้อยละน้ำหนักแห้งของ AE-precipitate และ MAE-precipitate อยู่ในช่วง 7.19-9.00% และ 29.99-32.12%, ตามลำดับ และค่าปริมาณของ AE-residue และ MAE-residue อยู่ในช่วง 59.07-60.19% และ 41.14-53.27%, ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธี MAE มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าวิธี AE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากพลังงานไมโครเวฟถูกส่งตรงไปยังวัตถุดิบด้วยอันตรกิริยาระดับโมเลกุล (molecular interaction) โดยคลื่นไมโครเวฟจะเปลี่ยนไปเป็นความร้อน เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายสกัด น้ำสามารถดูดซึมพลังงานไมโครเวฟได้สูงแต่จะกระจายพลังงานได้ต่ำ เมื่อมีน้ำในของแข็ง (สมุนไพร) ทำให้อุณหภูมิในพืชสมุนไพรสูงขึ้นและเกิดการแตกของเซลล์แล้วปล่อยสารสำคัญออกมาในตัวทำ

ละลาย เรียกว่าการเกิดปรากฏการณ์นี้ว่า superheating (ชนภัทร ทรงศักดิ์, 2559) ซึ่งในที่นี้หมายถึงเกิดการแตกของเซลล์เห็ดและทำให้สารที่อยู่ภายในที่สามารถละลายน้ำได้คือออกมา เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ จึงทำให้ปริมาณ MAE- precipitate สูงกว่า AE- precipitate อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มเวลาการสกัดให้เพิ่มขึ้น (15 ถึง 45 min) พบว่าเวลาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อวิเคราะห์ห้อทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างวิธีและเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยต่อปริมาณส่วนตกตะกอนแต่มีอิทธิพลต่อต่อปริมาณส่วนตกค้างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4.1 Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 120°C on residue yields and precipitate yields of *P. sajor-caju* with different time.

Treatment		Residue (% db) ¹	Precipitate (% db) ²
AE 120°C	15 min	60.19 ± 0.58 ^a	7.19 ± 0.36 ^b
	30 min	59.30 ± 1.14 ^a	7.57 ± 0.40 ^b
	45 min	59.07 ± 0.99 ^a	9.00 ± 0.30 ^b
MAE 120°C	15 min	53.27 ± 1.84 ^b	29.99 ± 1.52 ^a
	30 min	44.84 ± 2.18 ^c	31.48 ± 0.04 ^a
	45 min	41.14 ± 0.73 ^c	32.12 ± 3.38 ^a
p-value of interaction		0.003	0.874

^{1,2} The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in each column represent significant differences between treatments ($p<0.05$).

4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition analysis)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรตตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) ของตัวอย่างเห็ดคนางฟ้าภูฐาน (native-MR) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 ค่าทั้งหมดแสดงในหน่วยร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง (% db) จากผลการวิเคราะห์พบว่า Native-MR มีความชื้นเฉลี่ย 4.17%, wet basis (wb) มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 18.31% สอดคล้องกับผลการทดลองของ Finimundy et al. (2018) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 17.29% ปริมาณไขมันและเถ้าที่ได้ใกล้เคียงกับ Goyal, Grewal, and Goyal (2006) เท่ากับ 1.96% และ 7.46%, ตามลำดับ ตัวอย่างเห็ดคนางฟ้าภูฐานมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ที่ 71.48% Nhi and Hung (2012) รายงานว่าในเห็ดกินได้มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 52.3-88.6% ซึ่งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ (กลูแคน มอนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์) น้ำตาล

แอลกอฮอล์ (sugar alcohols) ไกลโคเจน (glycogen) และไคติน (chitin) จากผลการทดลองพบว่าเห็นตัวอย่างให้พลังงาน 378.43 kcal/100 g ดังนั้นเห็นนางฟ้าภูฐานจึงเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและแร่ธาตุที่มีไขมันต่ำ (Aguiló-Aguayo et al., 2017)

ตารางที่ 4.2 Nutritional composition of *P. sajor caju* fruiting bodies (native-MR) expressed in dry weight basis (db).

Nutritional composition	Value (% db) ¹
Carbohydrates	71.48 ± 0.43
Crude protein	18.31 ± 0.26
Crude fat	2.14 ± 0.15
Ash	8.07 ± 0.06
Energy (kcal/100 g)	378.43 ± 0.61

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation.

จากตารางผลการทดลองที่ 4.3 แสดงผลและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอิทธิพลร่วมหรือปัจจัยหลักอันตรกิริยาระหว่างปัจจัย (interaction) ที่มีผลต่อร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง (% db) ของปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้าของส่วนตกค้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี AE และ MAE ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min (AE-R15, -R30, -R45 และ MAE-R15, -R30, -R45) ด้วยการเปรียบเทียบค่า p-value กับระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) พบว่าส่วนตกค้างของปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้ามีค่า 81.35-88.28%, 9.50-14.51%, 0.61-2.39%, และ 1.61-1.81%, ตามลำดับ การเพิ่มระยะเวลาการสกัดช่วยลดปริมาณโปรตีนและเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน MAE-residue อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์อิทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างวิธีและเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่าอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสองมีผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าโปรตีนและไขมันจะเหลืออยู่ในส่วนตกค้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี MAE มากกว่าการสกัดด้วย AE แต่อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองไม่มีผลต่อปริมาณเถ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.3 The chemical composition of AE- residues and MAE- residues of *P. sajor- caju* on dry weight basis (db).

Sample	Composition (% db) ¹			
	Carbohydrates	Crude protein	Crude fat	Ash
AE-R15	88.28 ± 0.29 ^a	9.50 ± 0.26 ^c	0.61 ± 0.03 ^c	1.61 ± 0.00
AE-R30	86.94 ± 0.25 ^a	9.91 ± 0.12 ^c	1.45 ± 0.19 ^{cd}	1.69 ± 0.32
AE-R45	86.81 ± 0.65 ^a	10.36 ± 0.12 ^c	1.02 ± 0.19 ^{dc}	1.81 ± 0.58
MAE-R15	81.35 ± 0.46 ^c	14.51 ± 0.32 ^a	2.39 ± 0.11 ^a	1.75 ± 0.03
MAE-R30	81.81 ± 0.01 ^{bc}	14.36 ± 0.07 ^a	2.02 ± 0.15 ^{ab}	1.80 ± 0.08
MAE-R45	83.47 ± 0.62 ^b	13.07 ± 0.59 ^b	1.74 ± 0.04 ^{bc}	1.72 ± 0.01
p-value of interaction	0.004	0.004	0.001	0.823

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in each column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.4 The chemical composition of AE-precipitates and MAE-precipitates of *P. sajor- caju* on dry weight basis (db).

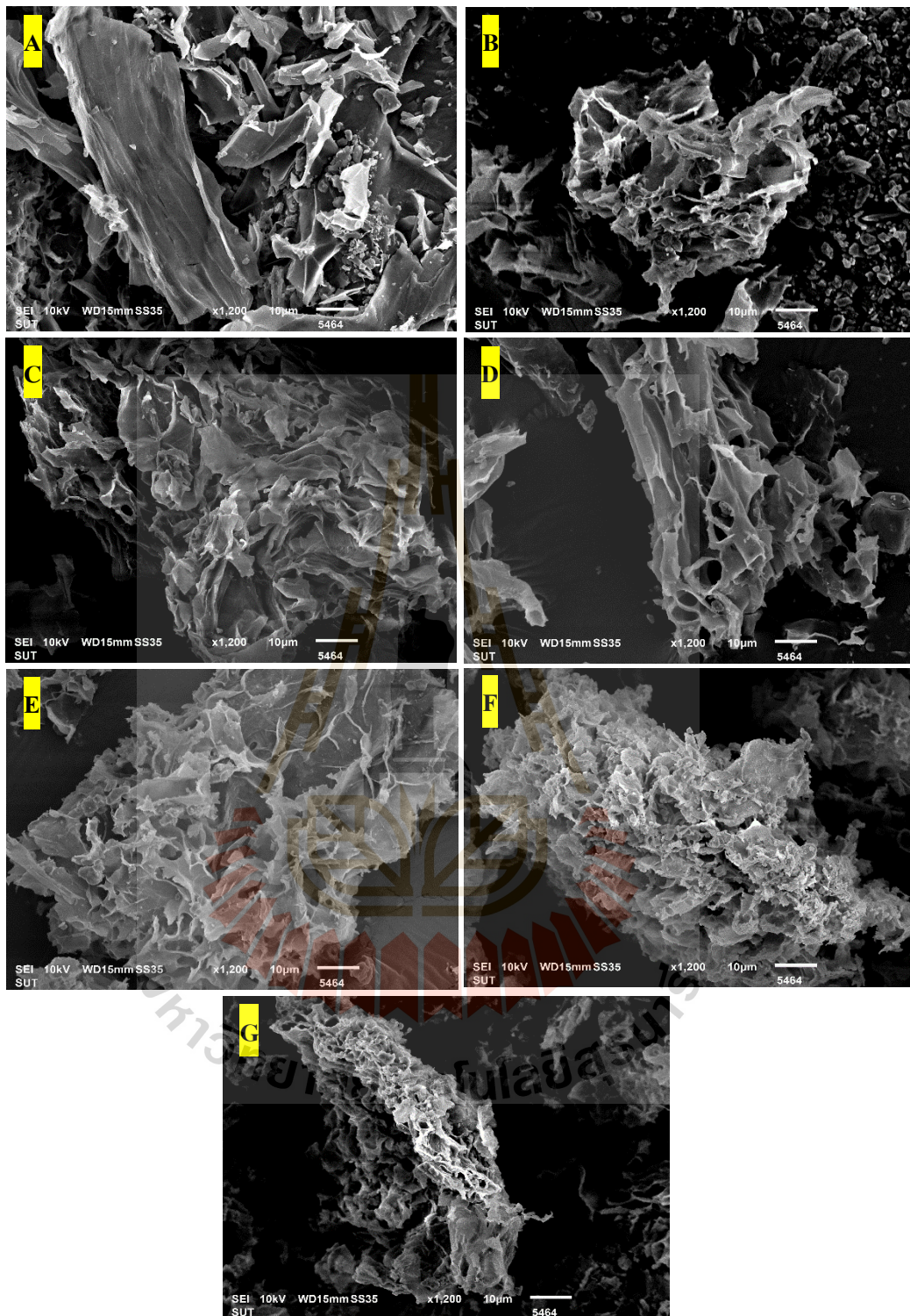
Sample	Composition (% db) ¹			
	Carbohydrates	Crude protein	Crude fat	Ash
AE-P15	90.53 ± 1.64	5.57 ± 0.65	0.50 ± 0.20	3.40 ± 0.80 ^a
AE-P30	93.23 ± 0.17	4.45 ± 0.06	0.40 ± 0.08	1.92 ± 0.18 ^{ab}
AE-P45	91.38 ± 0.13	5.21 ± 0.13	0.37 ± 0.25	3.05 ± 0.01 ^{ab}
MAE-P15	91.27 ± 0.06	5.96 ± 0.43	0.77 ± 0.30	2.00 ± 0.79 ^{ab}
MAE-P30	92.21 ± 0.16	5.58 ± 0.09	0.72 ± 0.14	1.49 ± 0.11 ^b
MAE-P45	91.97 ± 2.24	5.81 ± 1.91	0.77 ± 0.25	1.45 ± 0.09 ^b
p-value of interaction	0.517	0.820	0.917	0.244

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in each column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ส่วนตกตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C ที่เวลา 15, 30, และ 45 min (AE-P15, -P30, -P45 และ MAE-P15, -P30, -P45) ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้า พบว่ามีค่า 90.53-93.23%, 4.45-5.96%, 0.37-0.77%, และ 1.45-3.40%, ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 4.4 ดังนั้นจะเห็นว่าในส่วนตกตะกอนมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่แล้วคือพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายได้ในน้ำ เมื่อวิเคราะห์อิทธิพลของอันตรกิริยาระหว่างวิธีการสกัดและเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัยต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยตารางแสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวอย่างส่วนตกค้าง ส่วนตกตะกอน และองค์ประกอบทางเคมีของทั้งสองส่วนแสดงไว้ในในภาคผนวก ก (ตาราง ก1-ก10)

4.1.3 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค (Microstructural analysis)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของ native-MR, AE-R15-R45, และ MAE-R15-R45 ที่ขนาดกำลังขยายภาพ 1200 เท่า แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยรูปที่ 4.1 (A) แสดงให้เห็นถึงลักษณะโครงสร้างของ native-MR ที่ค่อนข้างสมบูรณ์มีรูปร่างกะทัดรัดและผิวเรียบ รูปที่ 4.1 (B-D) ปรากฏลักษณะโครงสร้างของผิวที่ขรุขระ หลังจากถูกสกัดด้วยวิธี AE และรูปที่ 4.1 (E-G) จะเห็นว่าลักษณะโครงสร้างของ MAE-residue มีพื้นผิวที่ความขรุขระ รอยแยกและมีรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก ดังนั้นลักษณะ โครงสร้างเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการสกัดด้วยวิธี MAE ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นอย่างมากในตัวอย่างเห็ด เนื่องจากถูกทำลายด้วยคลื่นไมโครเวฟจึงส่งผลให้ได้ส่วนตกตะกอนมากกว่าการสกัดด้วยวิธี AE ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al. (2013) แสดงภาพจาก SEM ลักษณะ โครงสร้างของเห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*) ที่ถูกทำลายให้เสียหายด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อสกัดพอลิแซ็กคาไรด์



รูปที่ 4.1 SEM images (1200x) of: (A) native-MR; (B, C, and D) AE-R15, -R30, and -R45, respectively; (E, F, and G) MAE-R15, -R30, and -R45, respectively

4.2 ผลของอุณหภูมิการสกัดหีดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Effect of extraction temperature on polysaccharides yield)

4.2.1 ผลของวิธีการสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อม้ำด้วยแรงดันไอน้ำและคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน (Effects of AE and MAE on the residue and precipitate yields of *P. sajo-caju*)

จากการศึกษาผลของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากหีดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี AE ที่อุณหภูมิ 80, 100, และ 120 และ MAE ที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min ผลการทดลองแสดงปริมาณของส่วนตกค้างและส่วนตกตะกอน แสดงค่าในรูปร้อยละโดยน้ำหนักแห้งของหีด (% db) แสดงดังรูปที่ 4.5A-4.6C พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วยวิธี AE จาก 80°C เป็น 120°C พบว่าไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณส่วนตกตะกอน (AE-R80-R120) อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ยกเว้นการสกัดที่ 10 และ 15 min ที่ทำให้ปริมาณ AE-residue ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 80°C เป็น 120°C สารประกอบที่ละลายน้ำได้ในสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิการสกัดของวิธี MAE จาก 100°C เป็น 140°C ทำให้ปริมาณส่วนตกค้างมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang and Weller (2006) และ Smiderle et al. (2017) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยไปทำลายหรือลดพันธะของสารประกอบออกจากเมทริกซ์และช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตการสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นของวิธี MAE ช่วยเพิ่มการสกัดสารประกอบจากเมทริกซ์หีด โดยเร่งการแตกของเซลล์และการแพร่ของสารสกัดลงในตัวทำละลาย (Li, Wang, & Wang, 2017; Smiderle et al., 2017) สอดคล้องกับ Afshari, Samavati, and Shahidi (2015) ซึ่งรายงานที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น ($> 95^{\circ}\text{C}$) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*) เนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์

อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระยะเวลาในการสกัดของทั้งสองวิธีจาก 5 ถึง 15 min พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะเดียวกัน ในสภาวะการสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลาการสกัดที่นานขึ้น ส่งผลให้ปริมาณร้อยละของ MAE residue ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จาก 58.81% ลดลงเหลือ 22.19% โดยพิจารณาจากตารางที่ 4.5 (A-C) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang and Weller (2006) ซึ่งรายงานว่า การสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟที่ระยะเวลาสั้น ๆ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณสารสกัดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบทั่วไป

หลังจากการสกัด พอลิแซ็กคาไรด์จากหีดนางฟ้าภูฐาน ถูกทำให้ตกตะกอนออกมาโดยใช้เอทานอล 95% ตารางที่ 4.6 (A-C) แสดงปริมาณร้อยละของส่วนตกตะกอนที่ถูกสกัดที่

อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆด้วยวิธี AE และ MAE จากการวิเคราะห์พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิการสกัดด้วยวิธี MAE ช่วยเพิ่มปริมาณ MAE-precipitate ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงกว่าจุดเดือดของน้ำ (120 และ 140°C) ในขณะที่เดียวกันการเพิ่มระยะเวลาการสกัดจาก 5 ถึง 15 min มีผลกระทบต่อปริมาณส่วนตกตะกอน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Smiderle et al. (2017) ซึ่งศึกษาการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้า (*P. ostreatus*) ด้วยวิธี MAE พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดจาก 5 ถึง 30 min ที่อุณหภูมิ 50, 115, และ 180°C พบว่าเวลาที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในทางตรงกันข้าม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาการสกัดของวิธี AE พบว่าสามารถช่วยเพิ่มปริมาณ AE-precipitate ได้อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากงานวิจัยของ Carbonero et al. (2012) และ Santos-Neves et al. (2008) ได้ทำการทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบ (ส่วนตกตะกอน) จากเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus spp.*) ด้วยวิธีการต้มน้ำร้อน 100°C นาน 6 h พบว่าได้ปริมาณผลผลิต 6.0-16.0% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6 (A-C) ซึ่งให้เห็นว่าวิธี MAE ให้ปริมาณส่วนตกตะกอนสูงกว่าวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนซึ่งเป็นวิธีการสกัดแบบทั่วไป เนื่องจากการสกัดด้วยวิธี MAE สามารถสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำจากเมทริกซ์เห็ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเร่งการแตกของเซลล์และการแพร่ของพอลิแซ็กคาไรด์ลงในตัวทำละลาย (Li et al., 2017; Smiderle et al., 2017) เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟที่สูงขึ้นที่ 10 และ 15 min พบว่าให้ผลผลิตของส่วนตกตะกอนไม่แตกต่างจาก 5 min ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่าง (MAE-residue และ MAE-precipitate) ที่ถูกสกัดที่เวลา 5 min มาใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ได้แสดงผลในหัวข้อถัดไป

ตารางที่ 4.5A Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 5 min on residue yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Residue (% db) ¹
AE-R80	68.11 ± 0.30 ^a
AE-R100	69.82 ± 1.42 ^a
AE-R120	61.63 ± 0.29 ^a
MAE-R80	58.29 ± 1.80 ^{bc}
MAE-R100	54.22 ± 4.09 ^{bc}
MAE-R120	35.62 ± 5.23 ^d
MAE-R140	25.24 ± 2.23 ^e

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.5B Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 10 min on residue yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Residue (% db) ¹
AE-R80	67.34 ± 0.29 ^a
AE-R100	68.75 ± 0.36 ^a
AE-R120	61.95 ± 1.10 ^a
MAE-R80	58.81 ± 0.68 ^{bc}
MAE-R100	55.98 ± 0.14 ^c
MAE-R120	29.91 ± 2.01 ^d
MAE-R140	22.97 ± 4.66 ^e

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.5C Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 15 min on residue yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Residue (% db) ¹
AE-R80	67.3 ± 1.81 ^a
AE-R100	67.78 ± 0.12 ^a
AE-R120	61.17 ± 0.23 ^a
MAE-R80	58.34 ± 3.16 ^{bc}
MAE-R100	54.48 ± 0.70 ^c
MAE-R120	31.26 ± 1.78 ^d
MAE-R140	22.19 ± 2.31 ^e

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.6A Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 5 min on precipitate yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Precipitate (% db) ¹
AE-P80	6.40 ± 0.21 ^c
AE-P100	6.51 ± 0.16 ^c
AE-P120	8.16 ± 1.14 ^c
MAE-P80	13.01 ± 1.21 ^b
MAE-P100	16.12 ± 2.42 ^b
MAE-P120	29.78 ± 2.76 ^a
MAE-P140	34.56 ± 0.65 ^a

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.6B Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 10 min on precipitate yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Precipitate (% db) ¹
AE-P80	6.60 ± 0.14 ^c
AE-P100	6.92 ± 0.22 ^c
AE-P120	7.84 ± 0.16 ^c
MAE-P80	11.59 ± 1.33 ^b
MAE-P100	13.88 ± 0.80 ^b
MAE-P120	31.05 ± 4.02 ^a
MAE-P140	33.58 ± 1.62 ^a

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

ตารางที่ 4.6C Effect of autoclave extraction (AE) and microwave-assisted extraction (MAE) 15 min on precipitate yields of *P. sajor-caju* with different temperature.

Sample	Precipitate (% db) ¹
AE-P80	6.75 ± 0.71 ^c
AE-P100	6.79 ± 0.64 ^c
AE-P120	7.06 ± 0.34 ^c
MAE-P80	10.23 ± 2.82 ^{bc}
MAE-P100	15.69 ± 0.22 ^b
MAE-P120	31.77 ± 3.09 ^a
MAE-P140	33.89 ± 0.49 ^a

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. Different letters in column represent significant differences between treatments (p<0.05).

4.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Chemical composition of Native-MR, residues, and precipitates)

ตัวอย่างเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ใช้ศึกษาในตอนต้นที่ 4.2 นี้ซื้อจากฟาร์มเห็ดละลมโพธิ์ อ.เมือง จ.นครราชสีมา ถูกนำมาเตรียมให้เป็นผงก่อนนำไปสกัด (native-MR) ตารางที่ 4.7 แสดงค่าองค์ประกอบทางเคมีของ native-MR (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง; %, db) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนมีค่า 64.82% และ 27.38% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ouzouni, Petridis, Koller, and Riganakos (2009) ได้รายงานว่าองค์ประกอบหลักในเห็ดป่ากินได้คือ คาร์โบไฮเดรตมีปริมาณเฉลี่ย 53.33-66.87% รวมไปถึงพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูแคนและไคติน และมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 21.57-34.77% native-MR มีปริมาณเถ้าและไขมันเท่ากับ 5.97% และ 1.83%, ตามลำดับ และให้พลังงาน 385.27 kcal/100 g ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Finimundy et al. (2018) ที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดนางฟ้าภูฐาน รายงานว่ามีเถ้า ไขมัน และพลังงานเท่ากับ 5.4%, 1.16 %, และ 384 kcal/100 g, ตามลำดับ เมื่อนำค่าองค์ประกอบทางเคมีของ native-MR ที่ทดลองในขั้นตอนนี้ไปเทียบกับค่าองค์ประกอบทางเคมีในตารางที่ 4.2 แล้วจะพบว่าปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าที่แตกต่างกันถึงแม้ว่าจะเป็นเห็ดชนิดเดียวกันก็ตาม ซึ่งความแตกต่างขององค์ประกอบเหล่านี้เกิดจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อม ชนิด วิธีการเพาะปลูก ล้วนแล้วแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด (Crisan and Sands, 1978) ทั้งสิ้น

ตารางที่ 4.7 Nutritional composition of *P. sajor caju* fruiting bodies (native-MR) expressed in dry weight basis (db).

Nutritional composition	Value (% db) ¹
Carbohydrates	64.82 ± 1.57
Crude protein	27.38 ± 1.60
Crude fat	5.97 ± 0.01
Ash	1.83 ± 0.05
Energy (kcal/100 g)	385.27 ± 0.28

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation.

ตารางที่ 4.8 Effect of microwave-assisted extraction (MAE) on the composition of residue and precipitate from the fruiting bodies of *P. sajor-caju*.

Sample	Composition (% db) ¹			
	Carbohydrates	Protein	Fat	Ash
MAE-R80	81.86 ± 0.44	13.75 ± 0.08	3.05 ± 0.55	1.34 ± 0.03 ^B
MAE-R100	76.36 ± 4.74	12.89 ± 2.27	8.43 ± 2.33	2.31 ± 0.14 ^A
MAE-R120	75.36 ± 1.75	15.12 ± 0.21	8.06 ± 1.95	1.46 ± 0.00 ^B
MAE-R140	74.31 ± 4.95	17.60 ± 3.24	6.03 ± 1.52	2.07 ± 0.20 ^A
MAE-P80	90.83 ± 3.98	5.66 ± 3.78	0.71 ± 0.15 ^a	2.79 ± 0.05 ^a
MAE-P100	90.21 ± 1.92	7.05 ± 1.89	0.56 ± 0.01 ^{ab}	2.18 ± 0.04 ^b
MAE-P120	95.67 ± 0.22	1.03 ± 0.16	0.33 ± 0.01 ^b	2.97 ± 0.06 ^a
MAE-P140	92.93 ± 0.32	4.46 ± 0.25	0.41 ± 0.00 ^b	2.20 ± 0.06 ^b

¹ The values are the mean of three replications ± standard deviation. The different capital and lower-case letters in the column represent the difference between treatments of residue and precipitate, respectively, at $p < 0.05$.

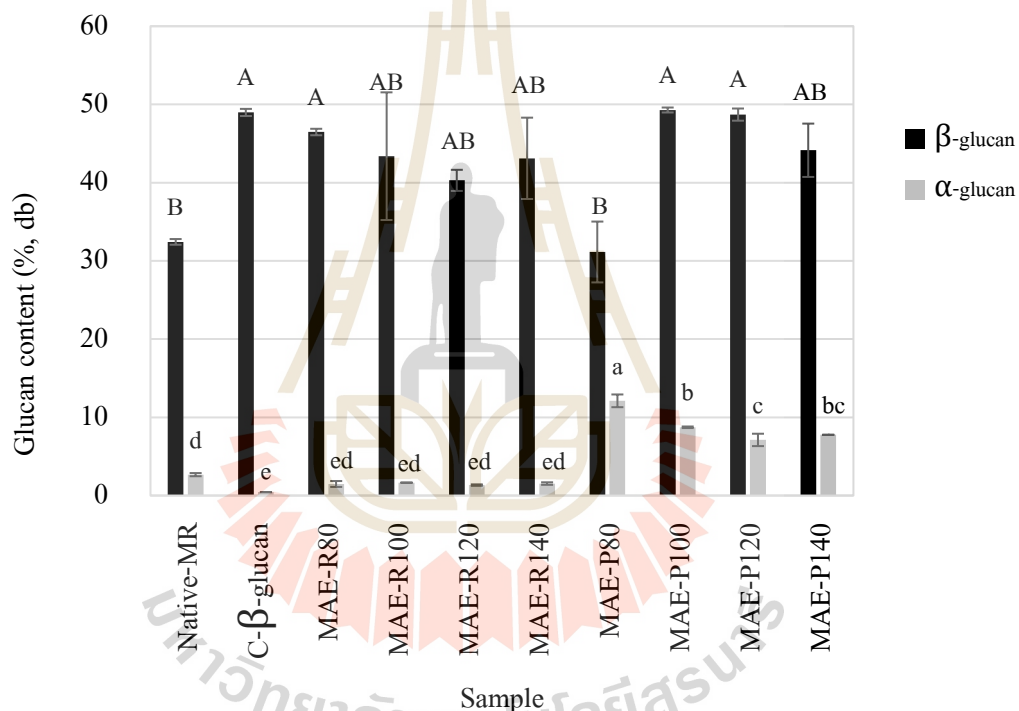
ตารางที่ 4.8 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของส่วนตกค้างและตกตะกอนที่ถูกสกัดด้วยวิธี MAE ที่อุณหภูมิ 80, 100, 120, และ 140°C เวลา 5 min (MAE-R80, -R100, -R120, -R140 และ MAE-P80, -P100, -P120, -P140, ตามลำดับ) (ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง) ในตัวอย่าง MAE-residue มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเถ้าเท่ากับ 74.31-81.86%, 12.89-17.60%, 3.05-8.43%, และ 1.34-2.31%, ตามลำดับ ผลของอุณหภูมิการสกัดที่สูงขึ้น (80 ถึง 140°C) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) MAE-precipitate มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต (พอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลัก) โปรตีน ไขมัน และเถ้าเท่ากับ 90.21-95.65%, 1.03-5.66%, 0.33-0.71%, และ 2.18-2.97%, ตามลำดับ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการสกัดด้วยวิธี MAE สามารถละลายคาร์โบไฮเดรตได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่กระนั้น การตกตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% ยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น โปรตีน ไขมัน เถ้า ยังรวมตกตะกอนมาด้วย นอกจากนี้อุณหภูมิการสกัดที่สูงขึ้นตั้งแต่ 80 ถึง 140°C ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน แต่มีผลต่อการลดลงของไขมันอย่าง

มีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 80°C และอุณหภูมิสูง (120 หรือ 140°C) Ondruschka and Asghari (2006); Tan, Tan, and Ho (2013) รายงานว่าอุณหภูมิการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟมีผลต่อความบริสุทธิ์ของสารสกัด โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิของการสกัดที่สูงขึ้นไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตของพอลิแซ็กคาไรด์เท่านั้น แต่ยังรวมถึงปริมาณโปรตีนและไขมันในสารสกัดด้วย ซึ่งส่งผลให้ส่วนตกตะกอนที่ได้ไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นการวิจัยในอนาคตจะมุ่งเน้นไปที่การทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์มากขึ้น

4.2.3 ผลของวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณสารเบต้ากลูแคน (Effect of MAE on β -glucan content analysis)

ปริมาณสารเบต้ากลูแคน (β -glucan) (ร้อยละ โดยน้ำหนักแห้ง; %, db) ของ native-MR, MAE-R80-R140 และ MAE-P80-P140 และตัวอย่างเบต้ากลูแคนที่ได้มาพร้อมกับชุดทดสอบ (C- β -glucan) ถูกวิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบ Mushroom and yeast beta glucan assay kit จากบริษัท Megazyme International แสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่า native-MR มีปริมาณเบต้ากลูแคน 32.43% สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lee and Kim (2005) ได้วิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนที่อยู่ในเห็ดกินได้พบว่าปริมาณเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 4.7-46.2% MAE-residue และ MAE-precipitate มีปริมาณเบต้ากลูแคนอยู่ระหว่าง 40.30-46.48% และ 31.14-49.29%, ตามลำดับ อุณหภูมิการสกัดที่ 80°C มีปริมาณเบต้ากลูแคนในส่วนตกค้าง (MAE-R80) (46.48%) มากกว่า native-MR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทางตรงกันข้าม MAE-P80 ให้ผลเบต้ากลูแคน (31.14%) ไม่แตกต่างจาก native-MR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 80 เป็น 100, 120, และ 140°C พบว่าให้ปริมาณเบต้ากลูแคนไม่แตกต่างจาก MAE-R80 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และมีผลทำให้ปริมาณเบต้ากลูแคนของ MAE-precipitate (ยกเว้นที่ 140°C) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะช่วยเอื้อต่อการละลายน้ำของเบต้ากลูแคนในเซลล์เห็ด ซึ่งมีลักษณะเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucan มีคุณสมบัติละลายน้ำ ในทำนองเดียวกัน Temelli (1997) รายงานการสกัดเบต้ากลูแคนจากข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงจะทำให้ได้เบต้ากลูแคนเพิ่มมากขึ้นด้วยเป็นลักษณะความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงที่น่าสนใจคือในปริมาณครึ่งหนึ่งของคาร์โบไฮเดรตของ native-MR, MAE-residue และ MAE-precipitate คือเบต้ากลูแคน แสดงให้เห็นว่าในเห็ดมีเบต้ากลูแคนในปริมาณมาก และประสิทธิภาพในการสกัดเบต้าสูงขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิสูง (100, 120, และ 140°C) นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-glucan ในตัวอย่างอีกด้วย ซึ่งพบว่าปริมาณแอลฟา-glucan จาก native-MR มีค่า 2.67% ดังนั้น native-MR มีปริมาณกลูแคนทั้งหมด 35.10% (α -, β -glucan) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mizuno and Nishitani (2013) รายงานว่ากลุ่มสิ่งมีชีวิตอาณาจักรฟังไจ (fungi) มีส่วนประกอบของกลูแคนทั้งหมดที่สามารถละลายน้ำได้

อยู่ระหว่าง 20-50% ปริมาณแอลฟาไกลูแคนใน MAE-precipitate (7.11-12.11%) ทุกอุณหภูมิแตกต่างจาก native-MR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากแอลฟาไกลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งจึงสามารถตกตะกอนร่วมออกมาด้วยเมื่อเติมเอทานอล และมีคุณสมบัติสามารถละลายน้ำได้ทำให้สามารถถูกสกัดออกมาได้ดี เมื่อใช้อุณหภูมิสกัดสูงขึ้นจาก 80 ถึง 140°C ปริมาณส่วนตกตะกอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจส่งผลต่อแอลฟาไกลูแคนที่ไม่ทนต่อความร้อนเกิดการสลายตัวได้ ในทางตรงกันข้ามเมื่ออุณหภูมิสกัดที่สูงขึ้นพบว่าปริมาณแอลฟาไกลูแคนใน MAE-residue ไม่แตกต่างจาก native-MR และ C- β -glucan อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่ง C- β -glucan มีเบต้ากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ 48.98%



รูปที่ 4.2 β -glucan and α -glucan content of native-MR, C- β -glucan, MAE-residues, and MAE-precipitates of *P. sajor-caju*

4.2.4 ผลของวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Effect of MAE on total phenolic content and antioxidant properties)

native-MR, C- β -glucan, MAE-R80-R140 และ MAE-P80-P140 ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content; TPC) โดยวิธี Folin-Ciocalteu

Colorimetric ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยใช้ Trolox, BHA, และ BHT เป็นสารมาตรฐาน แสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.9 ในหน่วย mg gallic acid, μmol Trolox, BHA, and BHT/ g sample, db จากการศึกษพบว่า MAE-P140 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า 7.21 μmol Trolox, 8.46 μmol BHA, 8.38 μmol และ BHT/ g sample, db เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และมีปริมาณ 8.63 μmol Trolox, 10.26 μmol BHA, 9.32 μmol BHT/ g sample, db เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS มีปริมาณสารประกอบ TPC มากที่สุดคือ 5.11 mg gallic acid/g sample, db ซึ่งมีความมากกว่า native-MR เกือบสองเท่า อย่างไรก็ตามผลของตัวอย่าง MAE-P80 และ MAE-R80-R140 ที่วัดปริมาณ TPC และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS มีค่าต่ำกว่า native-MR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้น พบว่าสามารถช่วยเพิ่มปริมาณ TPC และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใน MAE-precipitate ได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sulistiany, Sudirman, and Dharmaputra (2016) รายงานว่าเห็ดสกุลนางรมป่าส่วนไม่ซีเรียมและฟรุตติงบอดีมีปริมาณ TPC 2.02 และ 4.62 mg gallic acid/g extract, ตามลำดับ และมีปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูง งานวิจัยของ Kullu and Constaes (2014) รายงานว่าคลื่นไมโครเวฟจะไปทำลายพันธะและเพิ่มการแทรกซึมของตัวทำละลายลงในเมทริกซ์ ช่วยให้สารประกอบเกิดการละลายและถูกสกัดออกมา ซึ่งเป็นสารประกอบ TPC และสารต้านอนุมูลอิสระที่ปลดปล่อยจากเซลล์เห็ดคล้ายกับการสกัดเบต้ากลูแคน (รูปที่ 4.2) ที่มีปริมาณมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงขึ้น (100, 120 และ 140°C)

ในการวิจัยนี้ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของส่วนดอกตะกอน มีความสัมพันธ์กับสารประกอบ TPC สอดคล้องกับ Khatun, Islam, Cakilcioglu, Guler, and Chatterjee (2015) และ Sulistiany et al. (2016) จากงานวิจัยของ Boonsong, Klaypradit, and Wilaipun (2016) ได้รายงานว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและทำหน้าที่เป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) เป็นผลให้ เมื่อสารประกอบ TPC สูงขึ้นจึงทำให้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ที่อุณหภูมิการสกัด 140°C สารประกอบ TPC และสารต้านอนุมูลอิสระของ MAE-precipitate เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ native-MR ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.9 Total phenolic content and antioxidant properties of native-MR, C- β -glucan, MAE-residues, and MAE-precipitates of *P. sajor-caju*, on dry weight basis.

Sample code	Phenolics content ¹ (mg gallic acid/g sample, db)	DPPH ²			ABTS ³		
		$\mu\text{mol Trolox/g}$	$\mu\text{mol BHA/g}$	$\mu\text{mol BHT/g}$	$\mu\text{mol Trolox/g}$	$\mu\text{mol BHA/g}$	$\mu\text{mol BHT/g}$
Native-MR	2.35 ^{cd} \pm 0.10	3.67 ^b \pm 0.03	4.32 ^b \pm 0.04	4.25 ^c \pm 0.03	4.63 ^b \pm 0.04	5.47 ^b \pm 0.04	4.94 ^b \pm 0.03
C- β -glucan	2.36 ^{cd} \pm 0.05	2.40 ^d \pm 0.07	2.50 ^d \pm 0.10	2.99 ^d \pm 0.07	1.54 ^d \pm 0.19	2.11 ^e \pm 0.20	2.20 ^e \pm 0.16
MAE-R80	1.65 ^{de} \pm 0.03	2.21 ^d \pm 0.03	2.23 ^d \pm 0.04	2.81 ^d \pm 0.03	2.78 ^c \pm 0.07	3.46 ^{cd} \pm 0.08	3.30 ^{cd} \pm 0.06
MAE-R100	1.46 ^e \pm 0.08	2.11 ^{de} \pm 0.12	2.08 ^{de} \pm 0.17	2.70 ^{de} \pm 0.12	2.60 ^c \pm 0.17	3.26 ^{cd} \pm 0.19	3.14 ^d \pm 0.15
MAE-R120	1.42 ^e \pm 0.03	2.13 ^{de} \pm 0.05	2.11 ^{de} \pm 0.08	2.73 ^{de} \pm 0.05	2.62 ^c \pm 0.02	3.29 ^{cd} \pm 0.02	3.16 ^d \pm 0.02
MAE-R140	1.26 ^e \pm 0.18	0.92 ^f \pm 0.21	0.37 ^f \pm 0.30	1.52 ^f \pm 0.21	1.21 ^d \pm 0.15	1.76 ^e \pm 0.16	1.91 ^e \pm 0.13
MAE-P80	1.48 ^e \pm 0.14	1.74 ^e \pm 0.02	1.54 ^e \pm 0.03	2.33 ^e \pm 0.02	2.04 ^{cd} \pm 0.01	2.66 ^{de} \pm 0.01	2.65 ^{de} \pm 0.01
MAE-P100	2.62 ^c \pm 0.51	3.01 ^c \pm 0.25	2.41 ^d \pm 0.36	4.21 ^c \pm 0.25	2.65 ^c \pm 0.49	3.77 ^c \pm 0.53	4.03 ^c \pm 0.43
MAE-P120	3.53 ^b \pm 0.26	3.77 ^b \pm 0.02	3.51 ^c \pm 0.03	4.96 ^b \pm 0.02	3.99 ^b \pm 0.08	5.22 ^b \pm 0.08	5.21 ^b \pm 0.07
MAE-P140	5.11 ^a \pm 0.06	7.21 ^a \pm 0.07	8.46 ^a \pm 0.10	8.38 ^a \pm 0.07	8.63 ^a \pm 0.38	10.26 ^a \pm 0.42	9.32 ^a \pm 0.34

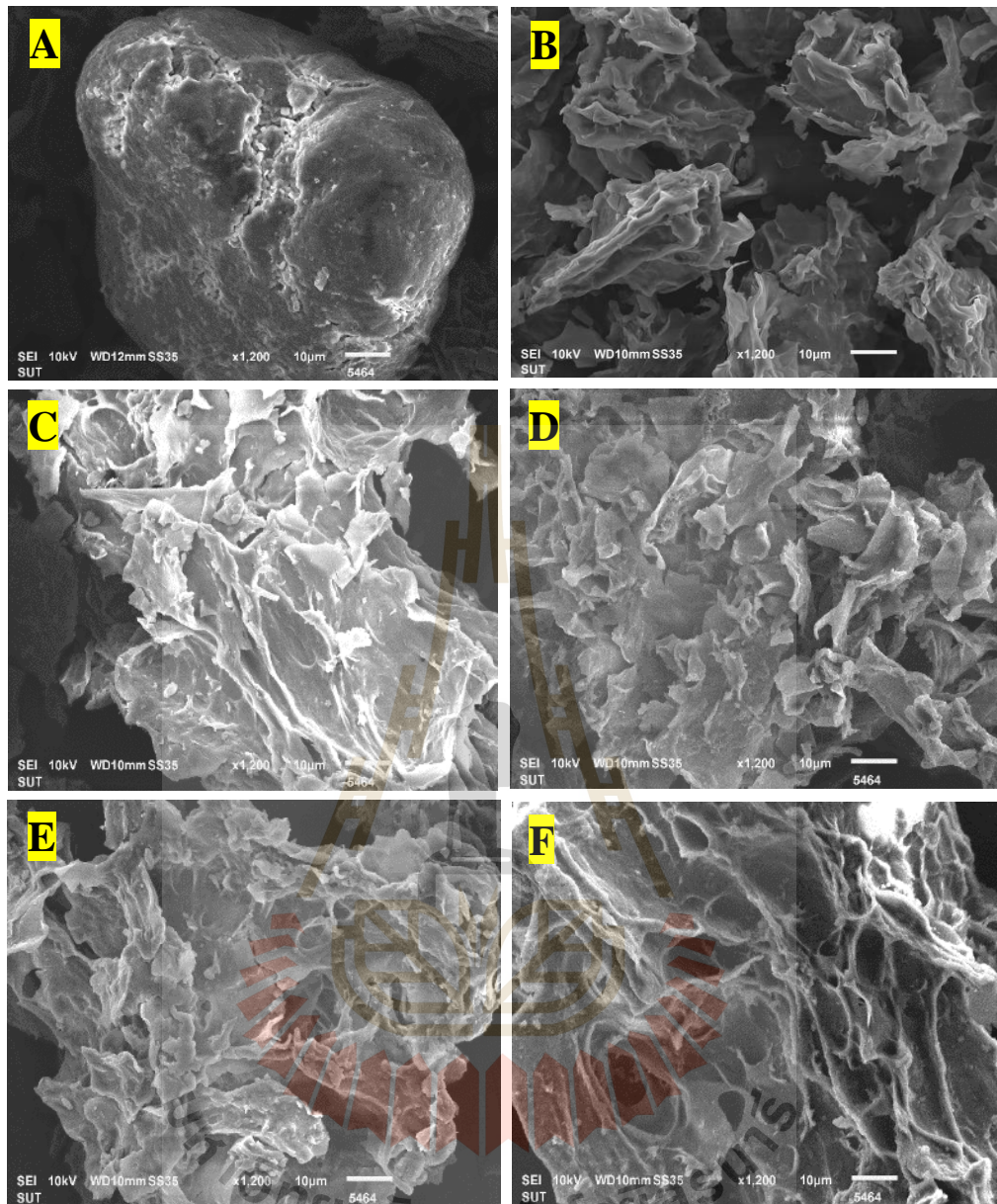
^{1,2,3} The values are the mean of three replications \pm standard deviation. Different letters in each column represent significant differences between treatments ($p < 0.05$).

4.2.5 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค (Scanning electron microscopy; SEM)

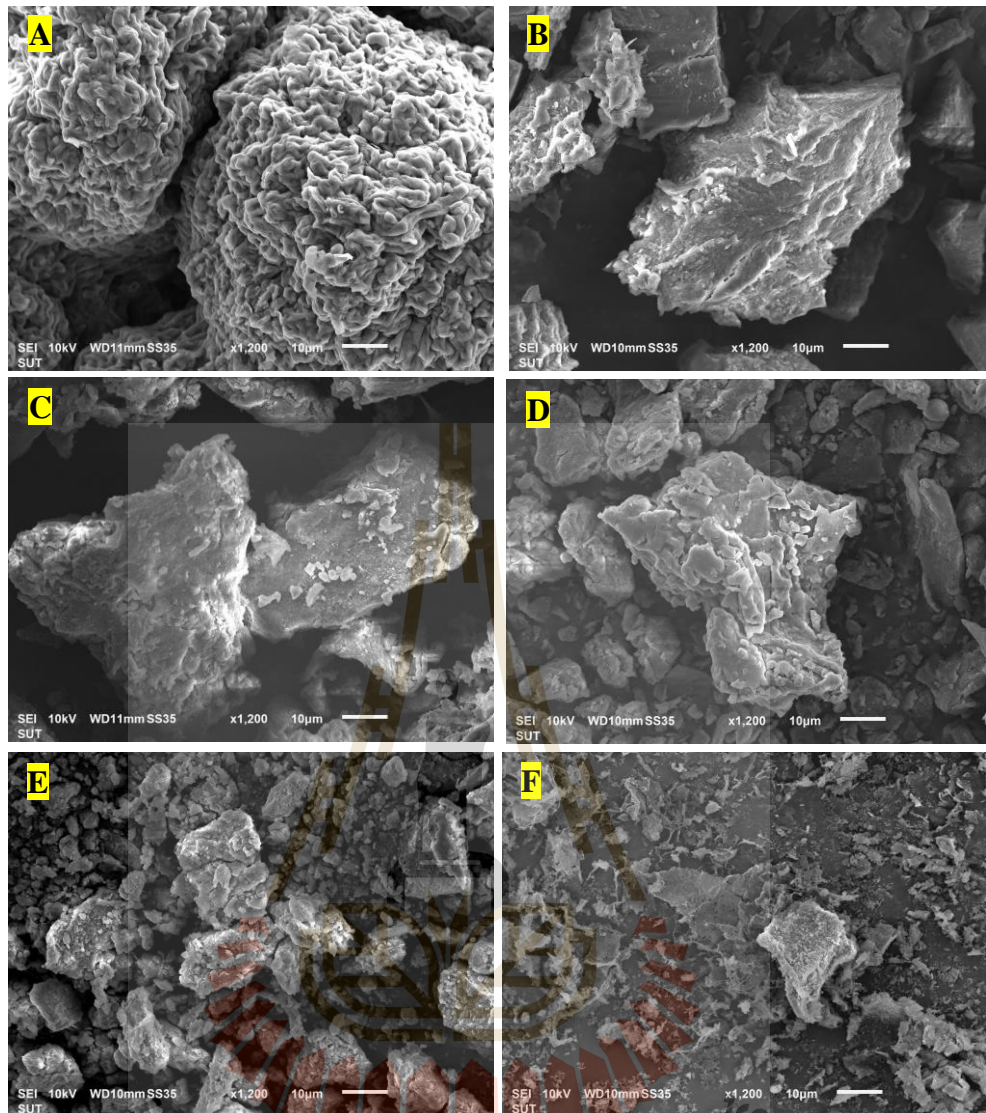
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ถูกนำมาวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของตัวอย่าง ขนาดกำลังขยายภาพ 1200 เท่า ภาพ SEM ของตัวอย่างแสดงในรูปที่ 4.4 จากรูปที่ 4.3 (A) แสดงสัณฐานวิทยาและพื้นผิวของ Native-MR ซึ่งเป็นผงแห้งที่ยังไม่ผ่านการสกัด มีโครงสร้างที่หนาแน่นและผิวเรียบ รูปที่ 4.3 (C-F) แสดงลักษณะระดับจุลภาคของ MAE-R80-R140 ซึ่งสารตกค้างที่ถูกสกัดด้วยไมโครเวฟมีความเป็นรูพรุนและถูกทำลายมากกว่าสารตกค้างที่ถูกสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำอุณหภูมิ 120°C นาน 5 min (AE-R120) แสดงดังรูปที่ 4.3 (B) จึงทำให้วิธี MAE มีประสิทธิภาพการสกัดมากกว่าวิธี AE อุณหภูมิไมโครเวฟที่สูงขึ้น (จาก 80 ถึง 140°C) ทำให้เกิดโครงสร้างของสารตกค้างเกิดการแตก มีพื้นผิวเว้าแหว่งและมีรูพรุนที่มากขึ้น เพื่อปล่อยพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาในตัวทำละลายทำให้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้มากยิ่งขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Smiderle et al. (2017) ที่พบว่าผลของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากไมโครเวฟมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นด้วย ดังนั้นแล้วรูปภาพที่ได้จากการวิเคราะห์ SEM (รูปที่ 4.3 (C-F)) ยืนยันว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นของ MAE ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

รูปที่ 4.4 แสดงโครงสร้างของตัวอย่างที่ถ่ายด้วย SEM ขนาดกำลังขยายภาพ 1200 เท่า ลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของ C- β -glucan แสดงดังรูปที่ 4.4 (A) ซึ่งอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมสม่ำเสมอ พื้นผิวมีความขรุขระ สารตกตะกอนที่ได้จากวิธีการสกัดหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำอุณหภูมิ 120°C นาน 5 min (AE-P120) (รูปที่ 4.4 (B)) มีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) ลักษณะของโครงสร้างมีเนื้อแน่น พื้นผิวขรุขระ และรูปที่ 4.4 (C-F) แสดงภาพถ่าย SEM ของ MAE-P80-140

ลักษณะโครงสร้างของ MAE-P80-P140 ที่ได้จากการทำให้ตกตะกอนด้วยเอทานอล จะเห็นว่าโครงสร้างมีเนื้อแน่น มีรูปร่างและขนาดที่ไม่แน่นอน เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดสูงขึ้น จะส่งผลให้ขนาดของสารตกตะกอนเล็กลงตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากเมื่ออุณหภูมิสกัดที่สูงขึ้นจะไปย่อยสายพอลิแซ็กคาไรด์ให้มีขนาดสั้นลง จึงทำให้ได้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีขนาดเล็กด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2015) ที่แสดงภาพถ่าย SEM ของพอลิแซ็กคาไรด์ของเห็ด *Armillaria luteo-virens* ที่ได้จากการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ มีลักษณะเป็นผงแต่มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ซึ่งเป็นผลกระทบจากวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 4.3 The SEM images of: (A) Native-MR; (B) AE-R120; (C) MAE-R80; (D) MAE-R100; (E) MAE-R120; and (F) MAE-R140. The magnification is 1,200x.



รูปที่ 4.4 The SEM images of: (A) C- β -glucan; (B) AE-P120 ; (C) MAE-P80; (D) MAE-P100; (E) MAE-P120; and (F) MAE-P140. The magnification is 1,200x.

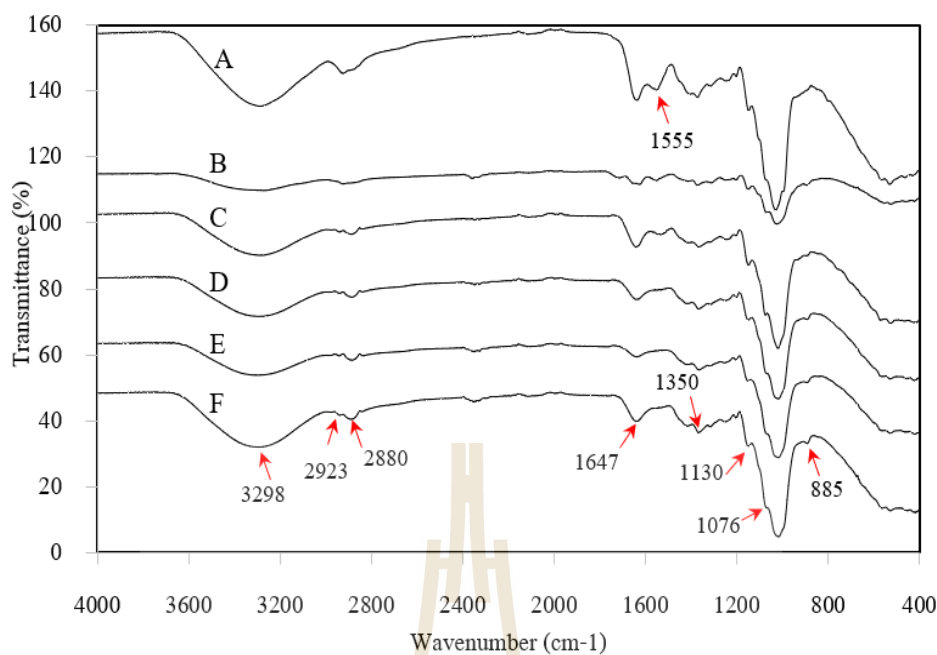
4.2.6 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางโครงสร้างเคมีของส่วนตกตะกอนโดยใช้ความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรด (FTIR analysis of MAE-precipitate)

FTIR microspectroscopy เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะเบต้ากลูแคนภายในตัวอย่างของ Native-MR, C- β -glucan และ MAE-P80-P140 แสดงดังรูปที่ 4.5 (A-F) ตามลำดับ สเปกตรัม FTIR ของตัวอย่างแสดงค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความถี่ 4000-400 cm^{-1} โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วย FTIR ของเบต้ากลูแคนบริสุทธิ์จากเห็ดนางฟ้าภูฐานจากงานวิจัยของ Se rmwittayawong et al. (2018);

Jantaramanant et al. (2014); Satitmanwivat et al. (2012) แต่ละตัวอย่างแสดงลักษณะของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของพอลิแซ็กคาไรด์ พบพีกที่เด่นชัดที่เลขคลื่น 3298 cm^{-1} และช่วงพีกแคบ ๆ $2880\text{-}2923\text{ cm}^{-1}$ ที่ระบุได้ว่ามีหมู่ฟังก์ชัน O-H และ C-H จะมีความถี่ในการสั่นในรูปแบบการยืด (stretching vibrations) ของพอลิแซ็กคาไรด์, ตามลำดับ (Sermwittayawong et al., 2018; Zhang et al., 2018)

พีกการดูดซับความถี่ในช่วง $1631\text{-}1647\text{ cm}^{-1}$ เป็นความถี่จากแรงยืดเหนี่ยวของน้ำ (Zhang et al., 2018; Satitmanwivat et al., 2012) และ โปรีติน (Klaus et al., 2011; Yin, Fan, Fan, Shi, and Gao, 2018) เนื่องจากเกิดการทับซ้อนกันระหว่างน้ำและ โปรีติน (Jantaramanant et al., 2014) จากผลการทดลอง ($1631\text{-}1647\text{ cm}^{-1}$) ซึ่งให้เห็นว่า native-MR, C- β -glucan, และ MAE-P80-P140 มีโปรีตินเป็นส่วนประกอบซึ่งสอดคล้องกับผลขององค์ประกอบทางเคมีที่แสดงดังในตารางที่ 4.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด MAE ไม่สามารถกำจัดโปรีตินที่จับกับพอลิแซ็กคาไรด์ออกได้อย่างสมบูรณ์

พีกการดูดซับความถี่ในช่วงสเปกตรัม $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ แสดงลักษณะที่สัมพันธ์กับน้ำตาล (วงแหวนไพเรโนส) เกิดการสั่นในรูปแบบการยืดของหมู่ฟังก์ชัน C-O-C และ C-OH (Kozarski et al., 2011; Satitmanwivat et al., 2012; Yin et al., 2018) (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan ให้ค่าการดูดกลืนแสงช่วง $1072\text{-}1078\text{ cm}^{-1}$ (Sermwittayawong et al., 2018; Kozarski et al., 2011) อย่างไรก็ตามไม่พบพีกการดูดกลืนแสงที่ความถี่ $993\text{-}994\text{ cm}^{-1}$ ที่เป็นกลุ่มของ (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan จากผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jantaramanant et al. (2014) และ Sermwittayawong et al. (2018) รายงานว่าพบ (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan ในช่วงความถี่ $1073\text{-}1078\text{ cm}^{-1}$ และไม่พบ (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan ($993\text{-}994\text{ cm}^{-1}$) ในพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน นอกจากนี้ในทุกตัวอย่างยกเว้น native-MR ยังพบช่วงพีกเล็ก ๆ $885\text{-}891\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นลักษณะของ α - และ β -glycosidic linkages เป็นการบ่งชี้ว่ามี α - และ β -glucan ในตัวอย่าง (Klaus et al., 2011; Kozarski et al., 2011; Zhang et al., 2018; Satitmanwivat et al., 2012)



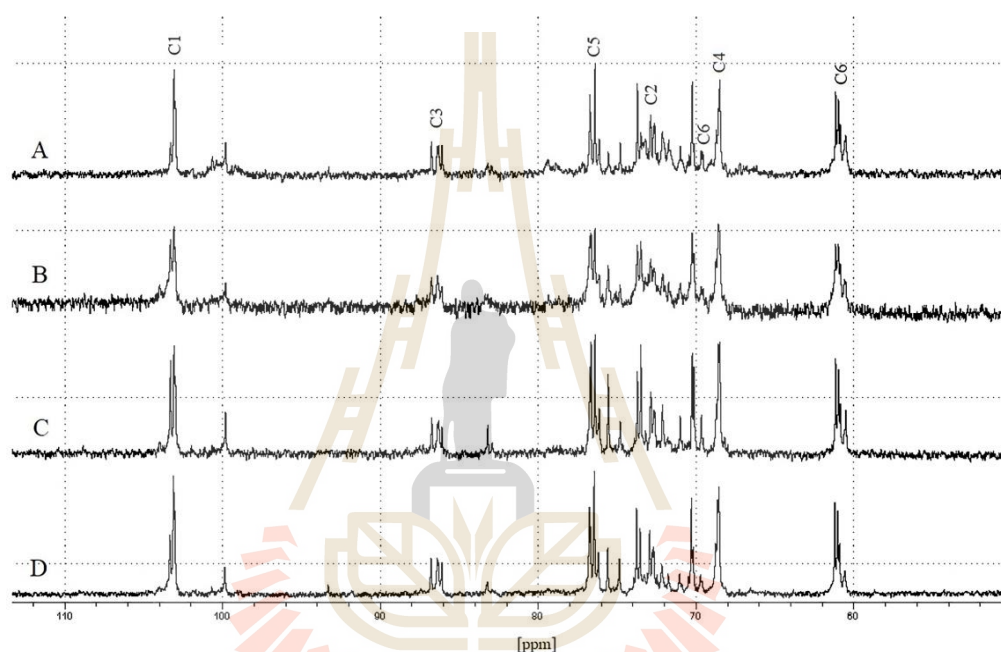
รูปที่ 4.5 FTIR spectra of the 4000 - 400 cm^{-1} region of (A) native-MR, (B) C- β -glucan, (C) MAE-P80, (D) MAE-P100, (E) MAE-P120, and (F) MAE-P140.

4.2.7 การวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบของส่วนตกตะกอนด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{13}C NMR analysis of MAE-precipitate)

จากการวิเคราะห์สเปกตรัมโครงสร้างของ β -glucan ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (NMR) ชนิด ^{13}C ของตัวอย่าง MAE-P80-P140 แสดงดังรูปที่ 4.6 (A-D) วิเคราะห์โครงสร้างโดยเทียบผลการทดลองจากงานวิจัยของ Smiderle et al. (2017); Carbonero et al. (2012); Fricova and Kovalakova (2013); Synytsya and Novak (2014) สัญญาณของสเปกตรัมรายงานในเทอมของค่า chemical shifts, δ (ppm) พบว่าตำแหน่งคาร์บอน (C1-C6) คือลักษณะของ (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucan สัญญาณที่ 103.03 ppm เป็นสัญญาณของ (1 \rightarrow 3)-linked C1 ของกลูแคนใน β -configuration สัญญาณที่เห็นเป็นยอดกราฟที่พบในช่วง 86.27-86.36 ppm เป็นสัญญาณของ C3 O-substituted ของ β -linkages ((1 \rightarrow 3)-linked C3) และสัญญาณตรงบริเวณ 69.62 ppm และ 60.90 ppm เป็นสัญญาณของ (1 \rightarrow 6)-linked C6 และ (1 \rightarrow 3)-linked C6 ของ β -glucan, ตามลำดับ (Smiderle et al., 2017; Carbonero et al., 2012) สัญญาณที่ 76.4 ppm, 72.9 ppm, และ 68.55 ppm คือสัญญาณของ C5, C2 และ C4 ของกลูแคน (Fricova and Kovalakova, 2013) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าในตัวอย่างส่วนตกตะกอนมี (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -glucan เป็นองค์ประกอบ และอุณหภูมิของการสกัดไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างของเบต้ากลูแคน นอกจากนี้

สัญญาณกราฟเล็กๆที่ 100 ppm และ 83.33 ppm เป็นสัญญาณของ C1 และ C3 ของ กลูแคนใน α -configuration (Smiderle et al., 2017)

จากผลการทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NMR จะเห็นว่ามีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Synytsya and Novak (2014) พบว่าในส่วนของฟรุคติงบอดีจากเห็ดประกอบด้วยกลูแคน 2 ประเภทหลักคือ branched (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -D-glucan และ linear (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan.

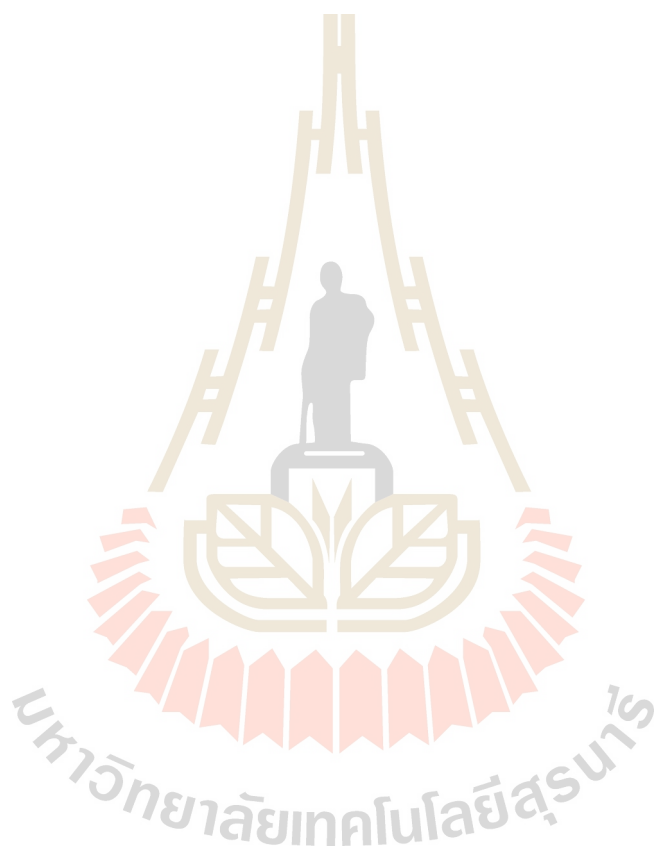


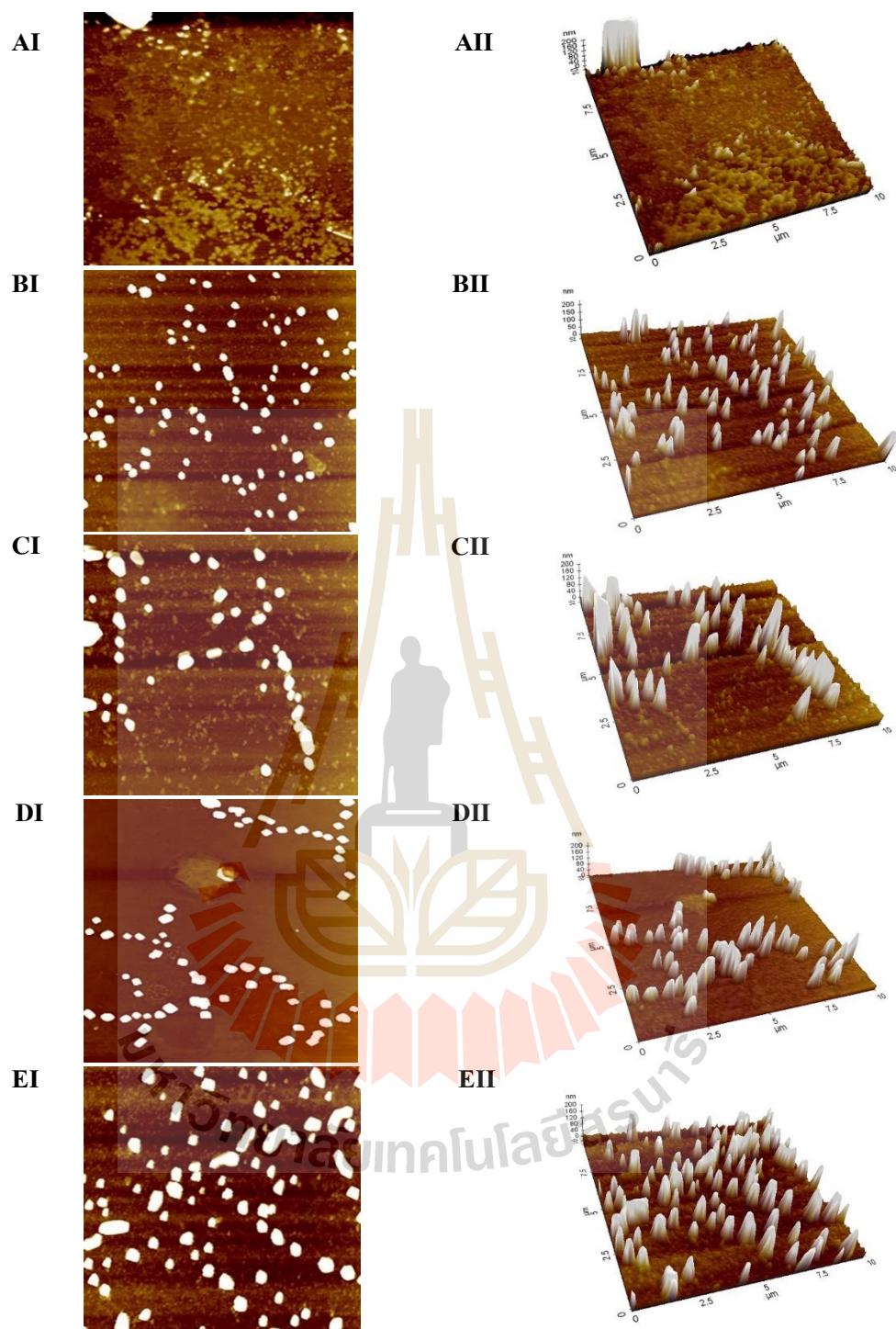
รูปที่ 4.6 ^{13}C NMR spectra of: (A) MAE-P80, (B) MAE-P100, (C) MAE-P120, (D) MAE-P140

4.2.8 การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของส่วนตกตะกอนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM analysis of MAE-precipitate)

รูปที่ 4.7 แสดงสัญญาณโมเลกุลของ AFM (10x10 μm) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ของ native-MR และ MAE-P80-P140 โดยเฉพาะอย่างยิ่งรูปที่ 4.7 (AI) แสดงโครงสร้างระนาบของพอลิแซ็กคาไรด์ของ native-MR ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันกระจายอย่างสม่ำเสมอและกลุ่มอนุภาคมีทรงกลมขนาดเล็ก ในทางตรงกันข้ามรูปที่ 4.7 (BI-EI) พอลิแซ็กคาไรด์ของส่วนตกตะกอนจะกระจายตัวน้อยลงและมีอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้น รูปที่ 4.7 (AII-EII) แสดงโครงสร้างสามมิติของพอลิแซ็กคาไรด์ของ native-MR และสารตกตะกอน ซึ่งบนพื้นผิวมีลักษณะที่ขรุขระ มีส่วนที่ยื่นออกมาไม่สม่ำเสมอและมีแหลมสูงชัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และ

Nie (2018) จากการเปรียบเทียบของความสูงในส่วนที่ยื่นออกมาของส่วนตักตะกอนซึ่งมีลักษณะสูงกว่าของ native-MR อาจเกิดจากการรวมกันของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มากกว่า (Li et al., 2017)





รูปที่ 4.7 AFM images of: (A) native-MR, (B) MAE-P80, (C) MAE-P100, (D) MAE-P120, (E) MAE-P140, where I and II represent AMF planar and three-dimensional images, respectively.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของวิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยคลื่นไมโครเวฟจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน และศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของส่วนตกค้างและตกตะกอน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน ดังนี้

5.1.1 ผลของระยะเวลาการสกัดหีดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาต่อการสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) เทียบกับวิธีการสกัดด้วยหม้อนึ่งมาเชื่อมด้วยแรงดันไอน้ำ (AE) ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min ผลการทดลองพบว่าวิธี MAE มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธี AE เนื่องจากสามารถช่วยเพิ่มปริมาณส่วนตกตะกอน (มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบหลัก) ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การเพิ่มระยะเวลาในการสกัดของการสกัดทั้งสองวิธีพบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณส่วนตกตะกอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังนั้นการใช้วิธี MAE ที่ระยะเวลาการสกัดสั้น (15 min) จึงมีประสิทธิภาพสำหรับการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน

5.1.2 ผลของอุณหภูมิการสกัดหีดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์

งานวิจัยศึกษาผลของวิธี MAE ต่อสารตกตะกอนจากเห็ดนางฟ้าภูฐานและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเบต้ากลูแคน เช่น สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาครั้งนี้ใช้อุณหภูมิในการสกัดคือ 80, 100, 120 และ 140°C เป็นเวลา 5, 10, และ 15 min ลักษณะทางกายภาพของสารตกตะกอนถูกวิเคราะห์ด้วย FTIR, ¹³C NMR, และ AFM นอกจากนี้วิธี AE ได้ถูกนำมาสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ (ส่วนตกตะกอน) เพื่อเทียบกับวิธี MAE ที่อุณหภูมิ 80, 100, และ 120°C ด้วยระยะเวลาเท่ากัน (5 ถึง 15 min) ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารตกตะกอนที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่อุณหภูมิ 80°C ถึง 120°C ในขณะที่ใช้เวลาการสกัดเพิ่มขึ้นกลับไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารตกตะกอนอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังนั้นระยะเวลาการสกัดสั้น ๆ (5 min) จึงเพียงพอต่อการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพต่อไป เช่น ปริมาณเบต้ากลูแคน พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออุณหภูมิการมากกว่า

100°C ($p > 0.05$) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดก่อนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 80°C ถึง 140°C ($p < 0.05$) และมีปริมาณมากที่สุดที่อุณหภูมิการสกัด 140°C ดังนั้นผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าสถานะที่เหมาะสมในการสกัดเบต้ากลูแคนคือวิธี MAE ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิการสกัดที่สูงที่ 140°C และใช้ระยะเวลาการสกัดสั้นเพียง 5 min นอกจากนี้ลักษณะทางกายภาพแสดงให้เห็นว่ามี (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -glucan ในส่วนสกัดก่อนด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การวิจัยเพิ่มเติมควรมุ่งเน้นไปที่การแยกเบต้ากลูแคนออกจากสารสกัดก่อนเพื่อทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติด้านจุลชีพ และด้านการอักเสบ

5.2.2 การศึกษาเพิ่มเติมถึงการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

5.2.3 การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสายพันธุ์เห็ดอื่น ๆ ต่อปริมาณสารสกัดก่อนและเบต้ากลูแคน



รายการอ้างอิง

- ชฎาพร นุชจั้งหรีด. (2549). ประโยชน์ของเห็ดนานาชาติ. สืบค้นจาก
http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/post.asp?method=Reply&TOPIC_ID=1393&FORUM_ID=7
- ชนภัทร ทรงศักดิ์. (2559). การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรด้วยคลื่นไมโครเวฟ. ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์. สืบค้นจาก <https://goo.gl/MVtX23>
- นิรนาม. (2548) เห็ดเข็มทอง. สืบค้นจาก <http://scratchpad.wikia.com/wiki>
- บุญเลิศ ไทยทัตกุล. (2551). การพัฒนาหลักสูตร การเพาะเห็ดแบบครบวงจร ของมูลนิธิพระดาบส. การศึกษาค้นคว้าอิสระ. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประชาชาติธุรกิจ. (2 ธันวาคม 2559). เกษตรฯออกมาตรฐานบังคับคุมผู้ผลิตเชื้อเห็ดเพื่อการค้า. สืบค้นจาก https://www.prachachat.net/news_detail.php?newsid=1480679713
- พรอริยา ฉรินัง. (2548). การผลิตซอสเห็ดปรุงรสโดยการย่อยด้วยกรด ต่าง และเอนไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 19.
- พัทธพร จอมเมืองบุตร. (2557). ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบต้ากลูแคนจากข้าวเหนียวดำ. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 45 (2), 153-156.
- พิชญา พานนนท์. (2555). ผลของสารโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำจากเห็ดกินได้ต่อกิจกรรมฟรีไบโอติก. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์. (2555). ไมโครเวฟ. เข้าถึงได้จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0401/microwave>.
- วิภาวรรณ ศรีมุข. (2550). เรื่องน่ารู้ของเห็ด. สืบค้นจาก
http://www.dss.go.th/dssweb/stricles/files/bsp_12_2550_Mushroom.pdf
- สาริต ไทยทัตกุล. (2546). เห็ดสมุนไพร “เห็ดอาหารที่เป็นยา”, เห็ดไทย. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, หน้า 18-34.
- สุภารัตน์ จันทร์เหลือง. (2558). การศึกษาหาปริมาณสารเบต้ากลูแคน โปรตีน และเส้นใยในเห็ดป่าที่ใช้บริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี. อุบลราชธานี:มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- อานนท์ เอื้อตระกูล. (2527). เห็ดนางฟ้าภูฐาน. เกษตรเกษตร. 3(103):17-20.
- Adebayo, E.A., Martinez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Escudero, H., Meneses, M.E., Avila-Nava, A., Castillo, I., and Bonilla, M. (2018). Comparative study of antioxidant and

- antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. tuber-regium*. **International Journal of Food Science and Technology**. 53(5):1316-1330.
- Afshari, K., Samavati, V., and Shahidi, S. A. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. **International journal of biological macromolecules**. 74:558-567.
- Aguiló-Aguayo, I., Walton, J., Viñas, I., and Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. **LWT-Food Science and Technology**. 77, 92-99.
- Alam, N., Yoon, K. N., Lee, J. S., Cho, H. J., Shim, M. J., and Lee, T. S. (2011). Dietary effect of *Pleurotus eryngii* on biochemical function and histology in hypercholesterolemic rats. **Saudi journal of biological sciences**. 18(4), 403-409.
- Amaral, A. E., Carbonero, E. R., Rita de Cássia, G. S., Kadowaki, M. K., Sasaki, G. L., Osaku, C. A., and Iacomini, M. (2008). An unusual water-soluble β -glucan from the basidiocarp of the fungus *Ganoderma resinaceum*. **Carbohydrate polymers**. 72(3), 473-478.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC international, 17th ed. Washington DC, U.S.A: **The Association of Official Analytical Chemistry**, 2000.
- Benito-Román, Ó., Alonso, E., Cocero, M. J., and Goto, M. (2016). β -Glucan recovery from *Ganoderma lucidum* by means of pressurized hot water and supercritical CO₂. **Food and bioproducts processing**. 98, 21-28.
- Bergendiova, K., Tibenska, E., and Majtan, J. (2011). Pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation, cellular immune response and respiratory tract infections in athletes. **European journal of applied physiology**. 111(9), 2033-2040.
- Bernas, E., Jaworska, G., and Lisiewska, Z. (2006). Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**. 5(1), 5-20.
- Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H. M., and Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food chemistry**. 88(3), 425-428.

- Boonsong, S., Klaypradit, W., and Wilaipun, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. **Agriculture and Natural Resources**. 50(2):89-97.
- Briones, G. L., Varoquaux, P., Chambroy, Y., Bouquant, J., Bureau, G., and Pascat, B. (1992). Storage of common mushroom under controlled atmospheres. **International journal of food science & technology**. 27(5), 493-505.
- Cai, M., Lin, Y., Luo, Y. L., Liang, H. H., and Sun, P. (2015). Extraction, antimicrobial, and antioxidant activities of crude polysaccharides from the wood ear medicinal mushroom *Auricularia auricula-judae* (Higher Basidiomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**. 17(6).
- Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Freitas, C.S., Utrilla, P. Galvez, J., Sila, E.V., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., and Iacomini, M. (2012). Chemical and biological properties of a highly branched β -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**. 90(2):814-819.
- Cha, Y. J., Alam, N., Lee, J. S., Lee, K. R., Shim, M. J., Lee, M. W., and Lee, T. S. (2012). Anticancer and immunopotentiating activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on mouse sarcoma 180. **Mycobiology**. 40(4), 236-243.
- Chang, S. T., and Miles, P. G. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact CRC Press. **New York**. 451.
- Chen, C., Shao, Y., Tao, Y., and Wen, H. (2015). Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity. **LWT-Food Science and Technology**. 64(2), 1263-1269.
- Chen, J., and Raymond, K. (2008). Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. **Vascular health and risk management**. 4(6), 1265.
- Chen, J., Zhang, X. D., and Jiang, Z. (2013). The application of fungal beta-glucans for the treatment of colon cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**. 13(5), 725-730.
- Crisan, E. V., and Sands, A. 1978. Nutritional value (pp. 137-168). **Academic Press, New York**.
- Demirbaş, A. (2001). Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. **Food Chemistry**. 75(4), 453-457.

- Deng, C., Hu, Z., Fu, H., Hu, M., Xu, X., and Chen, J. (2012). Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a β -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **International journal of biological macromolecules**. 51(1), 70-75.
- Finimundy, T. C., Barros, L., Calhella, R. C., Alves, M. J., Prieto, M. A., Abreu, R. M., and Ferreira, I. C. (2018). Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. **Food Chemistry**. 245:150-158.
- Fricova, O., and Kovalakova, M. (2013). Solid-state ^{13}C CP MAS NMR spectroscopy as a tool for detection of (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)- β -D-glucan in products prepared from *Pleurotus ostreatus*. **ISRN Analytical Chemistry**. 2013:https://doi.org/10.1155/2013/248164.
- Gao Y, Zhou S, Jiang W, Huang M and Dai X (2003). Effects of ganopoly (a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. **ImmunoInvest**. 32:201-15.
- Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J., and Zhou, S. (2004). A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) extract in patients with type II diabetes mellitus. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 6(1).
- Goff, D. C., Gerstein, H. C., Ginsberg, H. N., Cushman, W. C., Margolis, K. L., Byington, R. P., and ACCORD Study Group. (2007). Prevention of cardiovascular disease in persons with type 2 diabetes mellitus: current knowledge and rationale for the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. **The American journal of cardiology**. 99(12), S4-S20.
- Goyal, R., Grewal, R. B., and Goyal, R. K. (2006). Nutritional attributes of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju* mushrooms. **Nutrition and health**. 18(2), 179-184.
- Gutiérrez, A., Prieto, A., and Martínez, A. T. (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate research**. 281(1), 143-154.
- Handayani, D., Chen, J., Meyer, B. J., and Huang, X. F. (2011). Dietary Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) prevents fat deposition and lowers triglyceride in rats fed a high-fat diet. **Journal of obesity**. 2011.

- Heleno, S. A., Ferreira, R. C., Antonio, A. L., Queiroz, M. J. R., Barros, L., and Ferreira, I. C. (2015). Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. **Food Bioscience**. 11:48-55.
- Ifuku, S., Nomura, R., Morimoto, M., and Saimoto, H. (2011). Preparation of chitin nanofibers from mushrooms. *Materials*, 4(8), 1417-1425.
- Jantaramanant, P., Sermwittayawong, D., Noipha, K., Hutadilok-Towatana, N., and Wititsuwannakul, R. (2014). β -glucan-containing polysaccharide extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] stimulates glucose uptake by the L6 myotubes. **International Food Research Journal**. 21(2):779-784.
- Jose, N., Ajith, T. A., and Janardhanan, K. K. (2002). Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pufmonanus* (Fr.) Quel. (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 4(4).
- Kaufmann, B., Christen, P., and Veuthey, J. L. (2001). Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides. **Phytochemical analysis**. 12(5), 327-331.
- Khatun, S., Islam, A., Cakilcioglu, U., Guler, P., and Chatterjee, N.C. (2015). Nutritional qualities and antioxidant activity of three edible oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*). **NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences**. 72-73:1-5.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., and Van Griensven, L. J. (2011). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. **LWT-Food Science and Technology**. 44(10), 2005-2011.
- Kodama, N., Komuta, K., and Nanba, H. (2002). Can maitake MD-fraction aid cancer patients?. **Alternative medicine review**. 7(3), 236-239.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P., and Van Griensven, L. J. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. **Food Chemistry**. 129(4):1667-1675.
- Kullu, J., Dutta, A., and Constales, D. (2014). Experimental and modeling studies on microwave-assisted extraction of mangiferin from *Curcuma amada*. **3 Biotech**. 4(2): 107-120.

- Lee, Y.T., and Kim, Y.S. (2005). Water-solubility of β -glucans in various edible mushrooms. **Journal of Food Science and Nutrition**. 10(3):294-297.
- Li, K., Yu, M., Hu, Y., Ren, G., Zang, T., Xu, X., and Qu, J. (2016). Three kinds of *Ganoderma lucidum* polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice. **Chemico-biological interactions**. 247, 30-38.
- Li, X., Wang, L., and Wang, Z. (2017). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Hohenbuehelia serotina*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 98:59-66.
- Manzi, P., and Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**. 68(3), 315-318.
- Mizuno, M., and Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**. 52(3), 202-207.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S., and Hedjaroude, G. A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International immunopharmacology**. 7(6), 701-724.
- Nandi, A. K., Samanta, S., Maity, S., Sen, I. K., Khatua, S., Devi, K. S. P., and Islam, S. S. (2014). Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate polymers**. 99, 774-782.
- Nhi, N. N. Y., and Hung, P. V. 2012. Nutritional composition and antioxidant capacity of several edible mushrooms grown in the Southern Vietnam. of edible mushroom, pp. 137-168., New York, USA: S.T., Hayes, W.A. (Eds).
- Ondruschka, B., and Asghari, J. (2006). Microwave-assisted extraction—a state-of-the-art overview of varieties. **CHIMIA International Journal for Chemistry**. 60(6):321-325.
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., and Riganakos, K. A. (2009). Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. **Food Chemistry**. 115(4):1575-1580.
- Pramanik, M., Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D., and Islam, S. S. (2005). Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**. 340(4), 629-636.

- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. A., and Singh, G. S. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**. 2(2), 94.
- Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., and Islam, S. S. (2004). Structural characterization of an immunomodulating polysaccharide isolated from aqueous extract of *Pleurotus florida* fruit-bodies. **Medicinal Chemistry Research**. 13(6), 509-517.
- Ruthes, A. C., Carbonero, E. R., Córdova, M. M., Baggio, C. H., Santos, A. R. S., Sasaki, G. L., and Iacomini, M. (2013). *Lactarius rufus* (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β -d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate polymers**. 94(1), 129-136. <http://butane.chem.uiuc.edu/pshapley/GenChem2/A3/3.html>
- Santos-Neves, J.C., Pereira, M.I., Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., and Iacomini, M. (2008). A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**. 343(9):1456-1462.
- Satitimanwiwat, S., Ratanakhonokchai, K., Laohakunjit, N., Chao, L.K., Chen, S.T., Pason, P., Tachaapaikoon, C., and Kyu, K.L. (2012). Improved purity and immunostimulatory activity of β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60(21):5423-5430.
- Sermwittayawong, D., Patninan, K., Phothiphiphit, S., Boonyarattanakalin, S., Sermwittayawong, N., and Hutadilok-Tawatana, N. (2018). Purification, characterization, and biological activities of purified polysaccharides extracted from the gray oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.]. **Journal of Food Biochemistry**. 42(5):e12606.
- Shapley, P. (2012). Light and the electromagnetic spectrum. Retrieved from
- Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Mellinger, C. G., Sasaki, G. L., Gorin, P. and A., Iacomini, M. 2006. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**. 67(19), 2189-2196.
- Smiderle, F.R., Morales, D., Gil-Ramirez, A., de Jesus, L.I., Gilbert-Lopez, B., Lacomini, M. and Soler-Rivas, C. (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β -D-glucans from mushrooms. **Carbohydrate Polymers**. 156:165-174.

- Songsak, T. (2016). Extraction of active chemical constituent of herbal medicinal plant using microwave-assisted extraction technique. Retrieved from http://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=79(in Thai)
- Su, C. H., Lai, M. N., and Ng, L. T. (2017). Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifola frondosa*. **Food chemistry**. 220, 400-405.
- Sulistiany, H., Sudirman, L. I., and Dharmaputra, O. S. (2016). Production of fruiting body and antioxidant activity of wild *Pleurotus*. **HAYATI Journal of Biosciences**. 23(4):191-195.
- Synytsya, A., and Novak, M. (2014). Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**. 2(2):17.
- Synytsya, A., Mičková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., and Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate polymers**. 76(4), 548-556.
- Tan, M.C., Tan, C.P., and Ho, C.W. (2013). Effects of extraction solvent systems, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. **International Food Research Journal**. 20(6):3117-3123.
- Temelli, F. (1997). Extraction and functional properties of barley β -glucan as affected by temperature and pH. **Journal of Food Science**. 62(6):1194-1201.
- Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C., and Lo, Y. M. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Carbohydrate Polymers**. 88(2), 522-529.
- Veggi, P. C, Martinez, J., and Meireles, M. A. A. (2013). Chapter 2: Fundamentals of microwave extraction. In Chemat, F., Cravotto, G. (Editors), Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice. (15-52). Massachusetts: Springer US
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. **Physiology & behavior**. 94(2), 276-284.
- Wang, J., and Nie, S. (2018). Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**. 87:35-46.

- Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., and Yao, J. (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. **Carbohydrate Polymers**. 80(1):84-93.
- Wang, L., and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**. 17(6):300-312.
- Wang, Y., Li, Y., Ma, X., Ren, H., Fan, W., Leng, F., Yang, M., and Wang, X. (2018). Extraction, purification, and bioactivities analyses of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis*. **Industrial Crops & Products**. 122:596-608.
- Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**. 60(3), 258-274.
- Yin, C., Fan, X., Fan, Z., Shi, D., and Gao, H. (2018). Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. 111:446-454.
- Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., and Chen, W. Y. (2012). Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction. **Carbohydrate polymers**. 89(2):694-700.
- Zhang, A., Deng, J., Yu, S., Zhang, F., Jinhardt, R.J., and Sun, P. (2018). Purification and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide from the fruiting bodies of the *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 1158:221-226.
- Zhang, Z., Lv, G., He, W., Shi, L., Pan, H., and Fan, L. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. **Carbohydrate polymers**. 98(2), 1524-1531.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., and Xu, B. (2015). Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. **Journal of Food Composition and Analysis**. 41:165-173.
- Zrodowski, Z. (1995). The influence of washing and peeling of mushrooms *Agaricus bisporus* on the level of heavy metal. **Polish journal of food and nutrition sciences**. 1(04), 26-33.

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล

ตารางที่ ก.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณส่วนตกค้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี AE และ MAE
อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	514.78	514.777	273.94	0.000
Time, X ₂	2	92.60	46.299	24.64	0.001
X ₁ *X ₂	2	63.38	31.689	16.86	0.003
Error	6	11.27	1.879		
Total	11	682.03			

$R^2 = 98.35$; adjusted $R^2 = 96.97$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณส่วนตกตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี AE และ
MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	1625.63	1625.63	690.90	0.000
Time, X ₂	2	7.73	3.86	1.64	0.270
X ₁ *X ₂	2	0.65	0.32	0.14	0.874
Error	6	14.12	2.35		
Total	11	1648.12			

$R^2 = 99.14$; adjusted $R^2 = 98.43$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณคาร์โบไฮเดรตของส่วนตกค้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี
AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	78.965	78.9651	404.23	0.000
Time, X ₂	2	1.169	0.5854	2.99	0.125
X ₁ *X ₂	2	6.443	3.2217	16.49	0.004
Error	6	1.172	0.1953		
Total	11	87.750			

R² = 98.66; adjusted R² = 97.55; p<0.05 indicates statistical significance

ตารางที่ ก.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนของส่วนตกค้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี AE และ
MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	49.3285	49.3285	533.45	0.000
Time, X ₂	2	0.3772	0.1886	2.04	0.211
X ₁ *X ₂	2	2.8963	1.4481	15.66	0.004
Error	6	0.5548	0.0925		
Total	11	53.1568			

R² = 98.96; adjusted R² = 98.09; p<0.05 indicates statistical significance

ตารางที่ ก.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไขมันของส่วนตักข้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	3.1460	3.1460	177.67	0.000
Time, X ₂	2	0.2632	0.13159	7.43	0.024
X ₁ *X ₂	2	0.8634	0.43172	24.38	0.001
Error	6	0.1062	0.01771		
Total	11	4.3788			

$R^2 = 97.57$; adjusted $R^2 = 95.55$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไขมันของส่วนตักข้างที่ถูกสกัดด้วยวิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	0.007943	0.007943	0.11	0.757
Time, X ₂	2	0.017405	0.008702	0.12	0.893
X ₁ *X ₂	2	0.030445	0.015223	0.20	0.823
Error	6	0.453612	0.075602		
Total	11	0.509405			

$R^2 = 10.95$; adjusted $R^2 = 0.00$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณคาร์โบไฮเดรตของส่วนตกตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	0.0324	0.03239	0.02	0.880
Time, X ₂	2	6.6764	3.33818	2.57	0.156
X ₁ *X ₂	2	1.9168	0.95838	0.74	0.517
Error	6	7.7928	1.29881		
Total	11	16.4183			

$R^2 = 52.54$; adjusted $R^2 = 12.98$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนของส่วนตกตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	1.4941	1.4941	2.10	0.197
Time, X ₂	2	1.1514	0.5757	0.81	0.488
X ₁ *X ₂	2	0.2909	0.1454	0.20	0.820
Error	6	4.2637	0.7106		
Total	11	7.2002			

$R^2 = 40.78$; adjusted $R^2 = 0.00$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไขมันของส่วนตตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วย
วิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	0.331628	0.331628	7.21	0.036
Time, X ₂	2	0.014617	0.007309	0.16	0.857
X ₁ *X ₂	2	0.008077	0.004039	0.09	0.917
Error	6	0.276002	0.046000		
Total	11	0.630324			

$R^2 = 56.21$; adjusted $R^2 = 19.72$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

ตารางที่ ก.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณไขมันของส่วนตตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วย
วิธี AE และ MAE อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15, 30, และ 45 min

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Method, X ₁	1	3.9132	3.9132	17.88	0.006
Time, X ₂	2	1.9840	0.9920	4.53	0.063
X ₁ *X ₂	2	0.7893	0.3946	1.80	0.244
Error	6	1.3134	0.2189		
Total	11	7.9999			

$R^2 = 83.58$; adjusted $R^2 = 69.90$; $p < 0.05$ indicates statistical significance

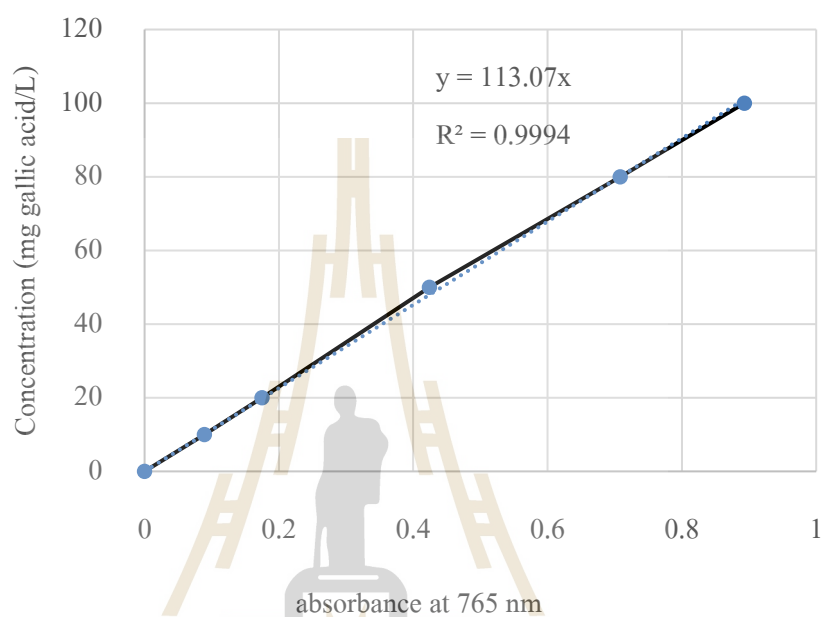
ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

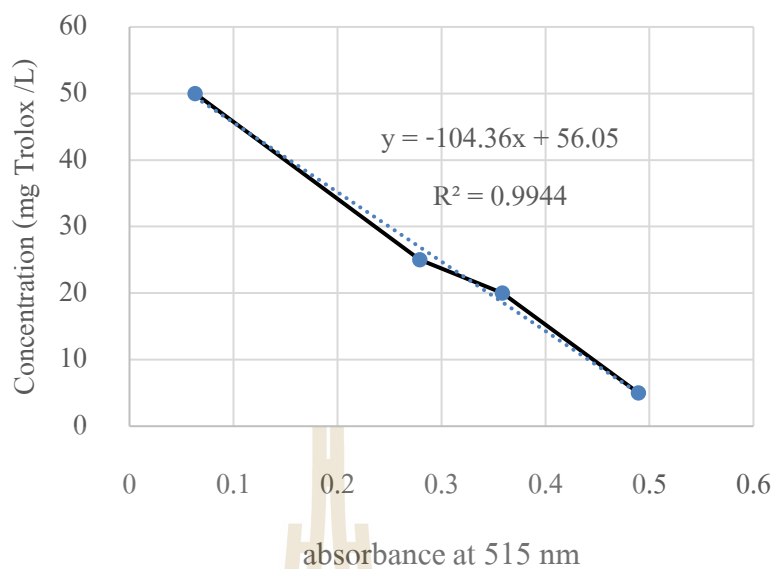
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 10, 20 50, 80, และ 100 mg gallic acid/mL ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ได้ผลดังแสดงในรูปที่ ข.1



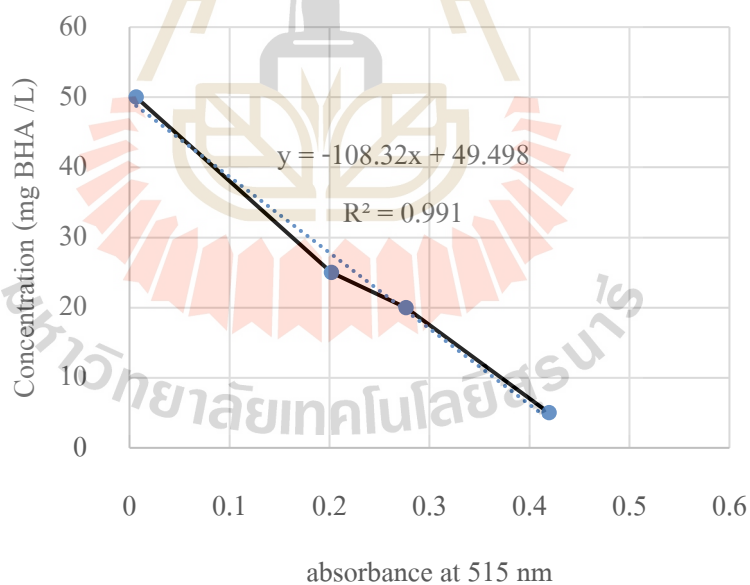
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) สำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช

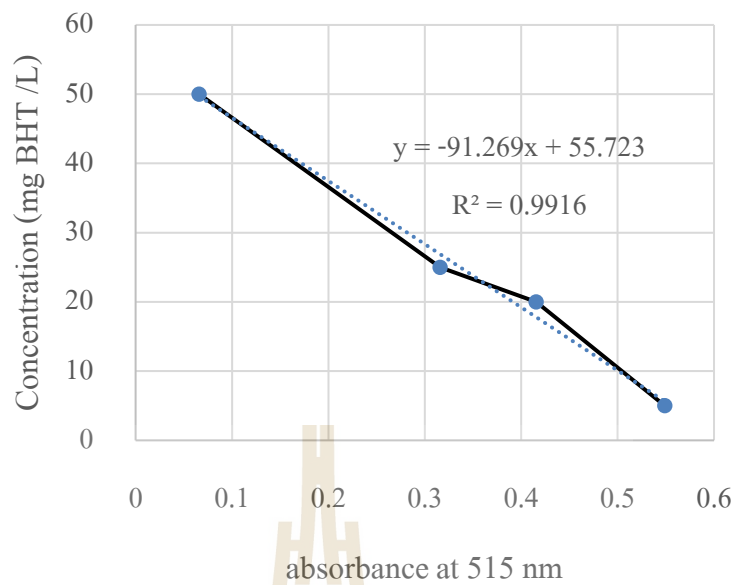
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอชหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox, BHA, และ BHT ที่ความเข้มข้น 5, 20, 25, และ 50 mg/L ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ได้ผลดังแสดงในรูปที่ ข.2-5



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีดีพีพีเอช



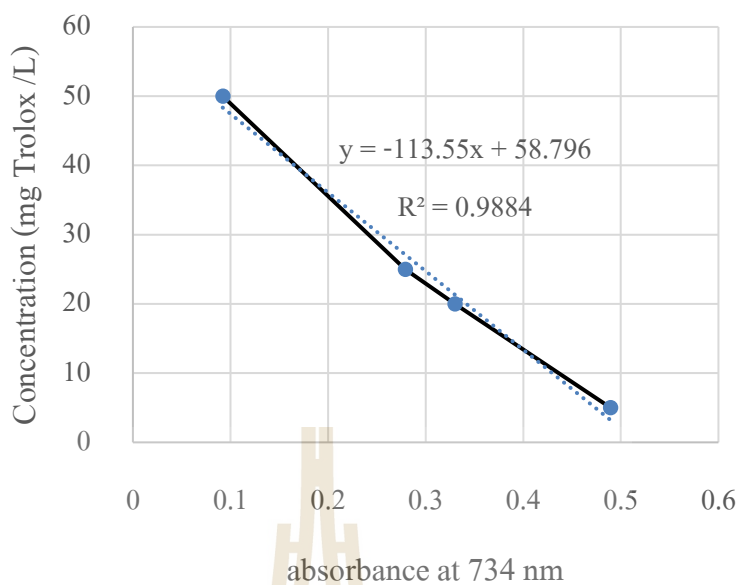
รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีดีพีพีเอช



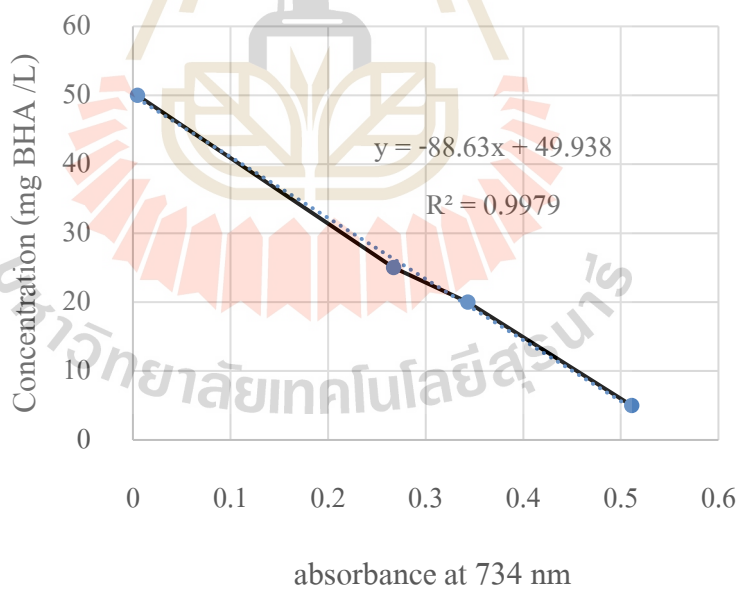
รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีดีพีพีเอช

ข.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส

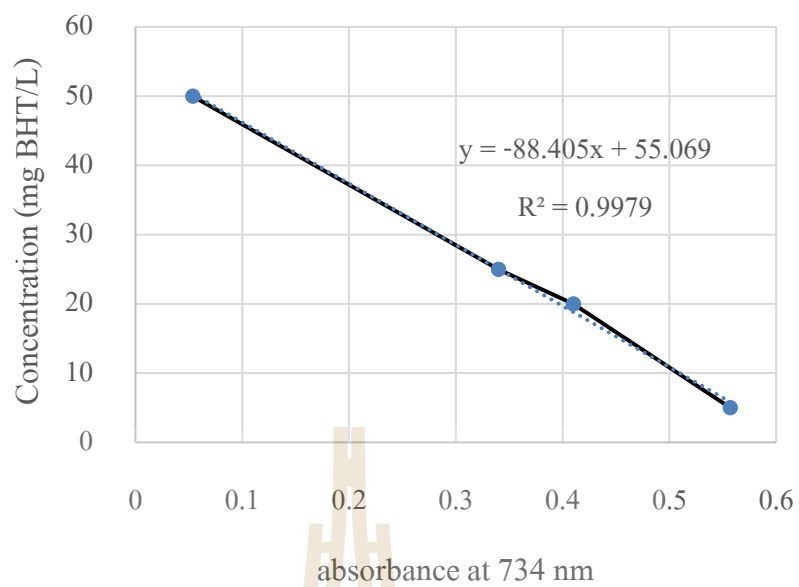
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอสหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox, BHA, และ BHT ที่ความเข้มข้น 5, 20, 25, และ 50 mg/L ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ได้ผลดังแสดงในรูปที่ ข.2-5



รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีเอบีทีเอส



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BHA สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีเอบีทีเอส



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BHT สำหรับวิเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีเอบีทีเอ

ภาคผนวก ค

บทความทางวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในระหว่างการศึกษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายชื่อบทความที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในระหว่างศึกษา

บทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Pornpimol Moolkaew, Tiraporn Junyusen*, Natthaporn Chatchavanthatri, Van Man Phan, and Siriporn Sornsomboonsuk. Microwave-assisted extraction of *Pleurotus sajor-caju* Polysaccharides and Characterization of Bioactive compound. Suranaree Journal of Science & Technology. 25 June, 2019. (Article in press).

บทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ (proceedings) ระดับนานาชาติ

Natthaporn Chatchavanthatri, Tiraporn Junyusen*, Weerachai Arjharn, Pornpimol Moolkaew, and Siriporn Sornsomboonsuk. Effects of Replacement of Sucrose by Maltitol on the Physicochemical and Sensorial Properties of Rose Apple Jam. The 10th International Conference on Food Engineering and Biotechnology (ICFEB 2019), Tokyo, Japan on March 26-29, 2019.

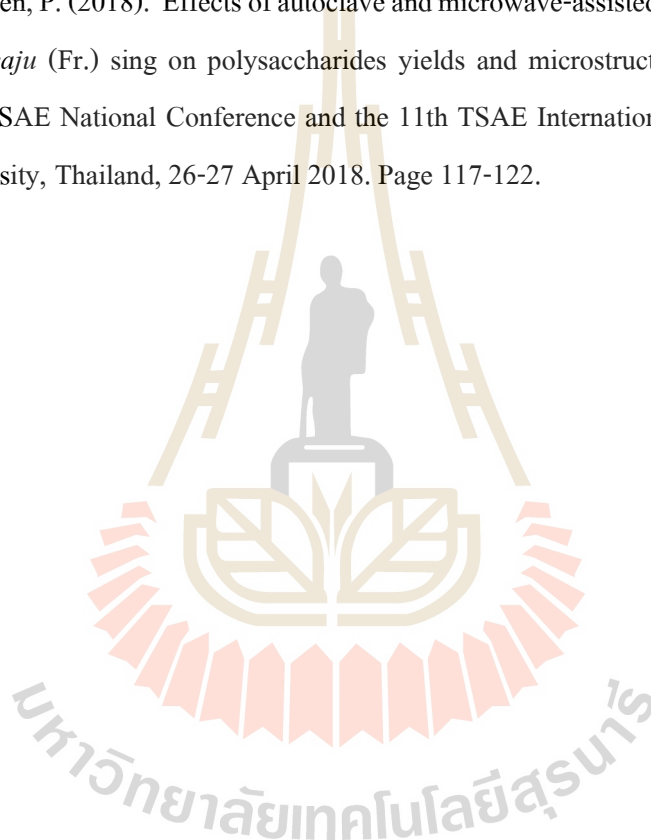
Siriporn Sornsomboonsuk, Tiraporn Junyusen*, Natthaporn Chatchavanthatri, Pornpimol Moolkaew, and Nadnapang Pamkhuntod. Evaluation of Physicochemical Properties of Spray Dried Bael Fruit Powder during Storage. The 10th International Conference on Food Engineering and Biotechnology (ICFEB 2019), Tokyo, Japan on March 26-29, 2019.

Sornsomboonsuk, S., Junyusen, T., Pamkhuntod, N., Chatchavanthatri, N., Moolkaew, P., and Junyusen, P. (2018). Effects of heat/moisture treatment on physicochemical and morphological characteristics of cassava starch. The 19th TSAE National Conference and the 11th TSAE International conference, Kasetsart University, Thailand, 26-27 April 2018. Page 40-44.

บทความวิจัยที่รับการตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ (proceeding) ระดับชาติ

Tiraporn Junyusen*, Natthaporn Chatchavanthatri, Pormpimol Moolkaew, Siriporn Sornsomboonsuk and Payungsak Junyusen. Effects of Maltodextrin Content on Physicochemical Properties of Spray Dried Instant Rose Apple Tea Powder. The 5th National Food Engineering Conference (FENETT' 2019), Suranaree University of Technology, Thailand, 28-29 March 2019. Page 45-52.

Moolkaew, P., Junyusen, T., Chatchavanthatri, N., Pamkhuntod, N., Sornsomboonsuk, S., and Junyusen, P. (2018). Effects of autoclave and microwave-assisted extractions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) sing on polysaccharides yields and microstructural characteristics. The 19th TSAE National Conference and the 11th TSAE International conference, Kasetsart University, Thailand, 26-27 April 2018. Page 117-122.



ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรพิมล มูลแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 8 มกราคม พ.ศ. 2537 เริ่มศึกษาชั้นประถมที่โรงเรียนบ้านศรีสุข ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนศรีสุขวิทยา และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ.2558

ปี พ.ศ.2559 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิศวกรรมเครื่องกลและระบบกระบวนการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะศึกษาได้รับทุนกิตติบัตินิตและเป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์แยมน้ำตาลน้อยจากผลไม้ท้องถิ่น

