



สภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการ
การเพาะเลี้ยงถั่วงอกเห็ดโดยใช้วิธีพื้นผิวดอบสนอง
คันสนีย์ ภูประกิจ*, มาริสา จาตุพรพิพัฒน์, ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย และอารี ฤทธิบุรณ์

**Inoculum preparative optimization for *Isaria tenuipes* production
by response surface methodology**

Sunsunee Phuprakit*, Marisa Jatupornpipat, Nuttawut Rungjindamai
and Aree Rittiboon

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520

*Corresponding author. E-mail address: sunsunee.sc28@gmail.com

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการผลิตถั่วงอกเห็ดโดยใช้วิธีพื้นผิวดอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาคือ ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ โดยการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design, CCD) พิจารณาผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาหน้าหนักแห้งของเส้นใย จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเร็วของการเขย่าที่ 178.9 รอบต่อนาที ปริมาตรอาหาร 105 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 106 ชั่วโมง สามารถผลิตเส้นใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 14.03 กรัมต่อลิตร ต่อมาได้ทำการการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเส้นใยบนอาหารแข็ง PDA พบว่าเส้นใยมีสีขาวฟู และจากการศึกษาบน slide culture พบว่าเส้นใยมีผนังกัน (septate hypha) และคอร์นินไดโอสปอร์ (conidiospore) มีรูปร่างเป็นท่อน รูปรี อยู่ที่อยู่ปลายของ conidiophores ส่วนดอกเห็ดถั่วงอกเห็ด (fruiting body) ที่เจริญบนดักแด้ไหม มีความยาวของดอกเห็ดอยู่ระหว่าง 2-3 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีสีเหลือง ลักษณะรูปร่างคล้ายปากรัง ปกคลุมด้วยคอร์นินไดโอสปอร์มากมายหลังจากเลี้ยงในสภาวะที่มีแสง เป็นเวลา 20 วัน

คำสำคัญ: ถั่วงอกเห็ด พื้นผิวดอบสนอง การหาสภาวะที่เหมาะสม การออกแบบส่วนประสมกลาง การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

Abstract

The aim of this research was to study optimal conditions for production of an inoculum of *Isaria tenuipes* using Response Surface Methodology (RSM). The three parameters of this study were shaking speed, medium capacity in 250 ml flask and cultural time by using Central Composite Design. The results were determined by dry weight of the mycelial mass of *I. tenuipes*. The optimal culture conditions for the inoculum preparation were 178.9 rpm, 105 ml and 106 h, respectively. Under this condition, the highest dry weight of mycelium was 14.03 g/l. Subsequently, *I. tenuipes* was morphologically studied. Its colonies on PDA white. Using a slide culture technique, *I. tenuipes* produces septate hypha, conidia are oval at the top of the conidiophore. The lengths fruiting bodies of *I. tenuipes* growing on silkworms pupa of fruiting bodies are between 2-3 cm with pale yellow. The shape of fruiting bodies is coral-like, covered with abundant conidia when the fungus was grown on silkworms pupa incubated for 20 days with light.

Keywords: Central Composite Design, *Isaria tenuipes*, optimization, Response Surface Methodology, inoculums preparation



บทนำ

เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*) หรือชื่อเดิม *Paecilomyces tenuipes* ซึ่งอยู่ใน Class Ascomycetes เป็นเชื้อราในกลุ่มราแมลง (Entomophagous fungus) เจริญเติบโตในที่ที่มีอากาศหนาวเย็นบนพื้นที่ถูกเขาหลายแห่งในประเทศเกาหลี (Kang, et al., 2010) เห็ดชนิดนี้เป็นปรสิตในดักแด้หรือตัวอ่อนของผีเสื้อในสกุล Lepidoptera (Xu, et al., 2006) เห็ดถั่งเช่าหิมะอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ในปัจจุบันมีการศึกษาและค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในเห็ดถั่งเช่าเพิ่มมากขึ้น เช่นพอลิแซ็กคาไรด์ (Lu, et al., 2007) นิวคลีโอไทด์ (Xu, et al., 2003) คอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน (Du, et al., 2012) สรรพคุณของสารเหล่านี้มีความสำคัญในทางการแพทย์และเภสัชวิทยาเป็นอย่างมาก สามารถช่วยฟื้นฟูระบบร่างกายให้แข็งแรงส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มการไหลเวียนเลือด (Chen, et al., 2008) ช่วยลดน้ำตาลในเลือด (Park, et al., 2011) สามารถรักษาอาการของโรคภูมิแพ้ โรคหอบหืด และวัณโรค (Zhu, et al., 1998) ด้านการเกิดเนื้องอก (Kim, et al., 2011) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในเซลล์มะเร็งต่าง ๆ (Nam, et al., 2011) ทั้งนี้ยังค้นพบว่าถั่งเช่าหิมะสามารถลดระดับไขมันในหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไขมันสูงได้ (Che, et al., 2014) จากคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากหลายทำให้ถั่งเช่าหิมะมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ในเชิงพาณิชย์

ในการผลิตเห็ดถั่งเช่าหิมะการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มาก อยู่ในช่วงที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์ที่วิเศษ ได้ช่วงอายุของเซลล์ที่เหมาะสม มีความแข็งแรงและทนทาน เมื่อมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารหรือสภาวะแวดล้อมจากเดิม จะส่งผลให้เชื้อเหล่านั้นสามารถเจริญเติบโต เกิดการสร้างดอกเห็ดได้เร็วขึ้น ทั้งนี้ส่งผลให้เวลาของการเพาะเลี้ยงมีระยะเวลาลดลงได้

ในปัจจุบันวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และการออกแบบการทดลองร่วมแบบส่วนผสมกลาง (Central Composite Design, CCD) ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะความเหมาะสมของอาหารในการเลี้ยงเชื้อ ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งวิธีนี้เป็นการนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้ในการสร้างแบบจำลองเชิงประจักษ์ (empirical model) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยา (interaction) ของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตามซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าการออกแบบโดยใช้วิธีดั้งเดิม คือสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้ และได้รับการยอมรับว่าเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาความเหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมเคมี เอนไซม์ และด้านเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก (Liang, et al., 2012; Öztürk, et al., 2010)

งานวิจัยนี้เกี่ยวกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวสำหรับกระบวนการผลิตถั่งเช่าหิมะ โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบส่วนประกอบกลางเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปใช้เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นเพื่อการศึกษากระบวนการเลี้ยงให้เกิดการสร้างดอกเห็ดบนวัสดุปลูกอินทรีย์ และพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*) ได้รับมาจากสถานีเห็ด อ.คลองสาม จ. ปทุมธานี โดยถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนหนอนไหม 40 กรัม เลี้ยงในขวดแก้วขนาด 16 ออนซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-90 ในที่มืด ทิ้งให้เส้นใยเจริญเต็มหนอนไหม เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นใช้แสงเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างดอกเห็ด ความเข้มแสง 300-400 ลักซ์ หลังจาก 15 วัน ในสภาวะใช้แสง เก็บรักษาเชื้อราโดยตัดชิ้นเห็ดจากขวดเลี้ยงเชื้อ แช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใส่ชิ้นเห็ดในไครโอทิว (cryotube)



ที่บรรจุกลีเซอรอลร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส (เก็บรักษาเชื้อใหม่ทุก ๆ 30 วัน)

2.1.2 วิธีการทดลองการเตรียมหัวเชื้อ

หีดถั่งเช่าหิมะเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง PDA เสริม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-90 ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน ใช้ Cork Borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณรอบนอกโคโลนีให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยจำนวน 4 ชิ้นวุ้น ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังนี้คือ มันฝรั่ง 200, ข้าวโพดอ่อน 50, กลูโคส 10, เปปโตน 5 และยีสต์สกัด 5 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการทดสอบตามการวางแผนการทดลองแบบ CCD (ตารางที่ 2) จากนั้นนำไปมบ่นเครื่องเขย่า (shaker) ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.1.3 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์สถิติ

ทำการออกแบบโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยการวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (CCD) นำมาใช้ในการหาสภาวะความเหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของหีดถั่งเช่าหิมะ โดยปัจจัยที่ต้องการศึกษา ที่ส่งผลต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งของถั่งเช่าหิมะ 3 ปัจจัย คือ ความเร็วรอบในการเขย่า (X_1) ปริมาตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (X_2) และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ (X_3) ในการออกแบบการทดลองแบบ CCD จะมีการออกแบบในทุกสภาวะความเหมาะสมของแต่ละปัจจัย และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลางของการทดลอง โดยแปรผันระดับของตัวแปรในแต่ละปัจจัยเป็น 5 ระดับคือระดับต่ำสุด ($-\alpha$), ระดับต่ำ (-1), ระดับกลาง (0), ระดับสูง ($+1$), และระดับสูงสุด ($+\alpha$) (ตารางที่ 1) ซึ่งสามารถออกแบบการทดลองได้ 20 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 2)

จากการวางแผนการทดลองแบบ CCD สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษา (dependent variable) คือความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อที่มีผลต่อตัวแปรตาม คือ น้ำหนักเส้นใยแห้ง โดยการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple linear regressions) วิเคราะห์โดยโปรแกรม SPSS และตรวจสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงอันตรกิริยาและเชิงยกกำลังสองที่มีค่า $p \leq 0.05$ มาสร้างสมการการถดถอย (สมการที่ 1) เพื่อหาค่าการคาดคะเน

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (1)$$

โดยที่ Y คือ น้ำหนักเส้นใยแห้ง X_1 คือ ความเร็วรอบในการเขย่า X_2 คือ ปริมาตรอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร X_3 คือ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ ในขณะที่ β_0 คือ ค่าคงที่ β_1, β_2 และ β_3 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression coefficients) β_{11}, β_{22} และ β_{33} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงกำลังสอง (quadratic polynomial term) และ β_{12}, β_{13} และ β_{23} คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงอันตรกิริยา (interaction term) ของตัวแปรอิสระ

2.1.4 วิธีวิเคราะห์ผล

ทำการเลี้ยงเชื้อตามแผนการทดลองในตารางที่ 2 และทำการวิเคราะห์ผลโดยทำการเก็บตัวอย่างเส้นใย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงแยกเส้นใยออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสทิ้ง นำเส้นใยหีดไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (AOAC, 2000) จากนั้นนำมาใส่ในโถตุตความชื้น นำผลของเส้นใยที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักแห้งเป็นกรัมต่อลิตร



ตารางที่ 1 ตัวแปรอิสระและระดับของตัวแปรอิสระทั้ง 5 ระดับ ตามแผนการทดลองแบบ CCD

ปัจจัย	รหัส	ระดับปัจจัย					หน่วย
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	
1. ความเร็วรอบในการเขย่า	X_1	65.9	100	150	200	234.1	รอบต่อนาที
2. ปริมาตรอาหารในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร	X_2	15.9	50	100	150	184.2	มิลลิลิตร
3. เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ	X_3	79.6	96	120	144	160.3	ชั่วโมง

2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA และการทำวิธี slide culture ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบ (compound microscope) ดูลักษณะของเส้นใย และลักษณะโคนิโดโอสปอร์ (กำลังขยาย 100x) จากนั้นเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าในดักแด้ใหม่บ่มให้เชื้อราเจริญจนสร้างเส้นใยและดอกเห็ดตรวจสอบลักษณะดอกเห็ดด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)

2.3 การวางแผนการทดลองและสถิติ

ทำการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design ที่มี 3 ตัวแปร 5 ระดับศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวการตอบสนองผลการทดลองนำมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 20.0 และกราฟเส้นโครงร่างพื้นผิวตอบสนอง (contour plot) โดยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7.0

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติต่อการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่งเช่าหิมะโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

การออกแบบผลการทดลองโดยใช้ RSM โดยมีตัวแปรที่เลือกศึกษา 3 ตัวแปร (ความเร็วรอบในการเขย่า ปริมาตรอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ) วางแผนการทดลองแบบ CCD ได้การทดลองทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง โดยผลค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเส้นใยแห้ง และค่าการคาดคะเน (ตารางที่ 2) จะเห็นว่าค่าทั้งสองมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยน้ำหนักเส้นใยแห้งที่มีค่าสูงจะใช้เวลาการเลี้ยงระหว่าง 96 - 120 ชั่วโมง ความเร็วรอบในการเขย่า 150 - 200 รอบต่อนาที และปริมาตรอาหารที่ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร อยู่ระหว่าง 100-150 มิลลิลิตร



ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการผลิตหัวเชื้อของเห็ดถั่งเช่าหิมะซึ่งคัดเลือกจากแผนการทดลองแบบ CCD พร้อมค่าการคาดคะเนกับค่าที่ได้จากการทดลอง

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย			รหัสปัจจัย			น้ำหนักเส้นใยแห้ง (g/l)	
	ความเร็วรอบในการเขย่า X1	ปริมาณอาหาร X2	เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ X3	X1	X2	X3	ค่าการคาดคะเน	ค่าการทดลอง
1	100	50	96	-1	-1	-1	5.29	4.81
2	200	50	96	1	-1	-1	9.6	8.57
3	100	150	96	-1	1	-1	4.83	4.09
4	200	150	96	1	1	-1	13.77	12.39
5	100	50	144	-1	-1	1	7.22	5.44
6	200	50	144	1	-1	1	8.46	7.82
7	100	150	144	-1	1	1	1.58	0.99
8	200	150	144	1	1	1	7.44	6.55
9	65.9	100	120	-1.682	0	0	2.03	1.42
10	234.1	100	120	1.682	0	0	9.49	11.11
11	150	15.9	120	0	-1.682	0	9.52	10.23
12	150	186.1	120	0	1.682	0	8.28	9.69
13	150	100	79.6	0	0	-1.682	10.42	11.85
14	150	100	160.3	0	0	1.682	6.73	7.42
15	150	100	120	0	0	0	12.33	12.33
16	150	100	120	0	0	0	12.33	12.32
17	150	100	120	0	0	0	12.33	12.21
18	150	100	120	0	0	0	12.33	12.24
19	150	100	120	0	0	0	12.33	12.27
20	150	100	120	0	0	0	12.33	12.22

จำนวนตัวอย่างการทดลอง 20 การทดลอง และทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.2 การวิเคราะห์ความเหมาะสมของแบบจำลอง

เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักเส้นใยแห้งที่ได้ทั้งหมด 20 ชุดการทดลอง และรหัสของปัจจัยที่ศึกษาทั้ง 3 ปัจจัยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างน้ำหนักเส้นใยแห้งกับปัจจัยที่ศึกษา เพื่อสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นตรง แสดงดังตารางที่ 3 โดยพิจารณาค่าความน่าจะเป็น หรือค่า p-value จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้น ค่าสัมประสิทธิ์เชิงยกกำลังสอง และค่าสัมประสิทธิ์เชิงอันตรกิริยาของแต่ละตัวแปร ซึ่งพจน์ที่มีความสำคัญต้องมีค่า $p \leq 0.05$ ตัวแปรนั้นจึงปรากฏในสมการ จากตารางที่ 3 พบว่าผลของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงปฏิสัมพันธ์ (interaction term) และทุกตัวแปรมีความน่าจะเป็นที่มียุทธศาสตร์ทางสถิติ $p \leq 0.05$ ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามกับตัวแปรอิสระ เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์ในสมการที่ 1 ได้ จะได้รูปแบบสมการที่เหมาะสมแสดงดังสมการที่ 2

$$Y = 12.334 + 2.545X_1 - 0.370X_2 - 1.097X_3 + 1.155X_1 X_2 - 0.769X_1 X_3 - 1.296X_2 X_3 - 2.519X_1^2 - 1.213 X_2^2 - 1.328 X_3^2 \quad (2)$$



ตารางที่ 3 ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นของแต่ละตัวแปร ค่าสัมประสิทธิ์เชิงยกกำลังสอง และค่าสัมประสิทธิ์เชิงอันตรกิริยา ของการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณของตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร ต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งของหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าหิมะ โดยโปรแกรม SPSS

รหัสของตัวแปร	Bata (β_i)	t-value	p-value
Constant	12.334	58.216	0.000 ^a
X ₁	2.545	17.666	0.000 ^a
X ₂	-0.370	-2.571	0.013 ^a
X ₃	-1.097	-7614	0.000 ^a
X ₁ X ₂	1.155	6.036	0.000 ^a
X ₁ X ₃	-0.769	-3570	0.001 ^a
X ₂ X ₃	-1.296	-6.774	0.000 ^a
X ₁ ²	-2.519	-18.347	0.000 ^a
X ₂ ²	-1.213	-8.835	0.000 ^a
X ₃ ²	-1.328	-9.676	0.000 ^a

กำหนดให้ ^a แยกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

3.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของแบบจำลองที่ใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ถือเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เพื่อได้ข้อมูลได้ถูกต้องและพยากรณ์ได้อย่างเที่ยงตรง โดยผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ตารางที่ 4) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะพิจารณาได้จากค่า p-value ของแบบจำลองการถดถอย (regression model) เมื่อมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า p-value ของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพิจารณาจากค่าแจกแจงปกติ F-value ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของแบบจำลองด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งแบบจำลองจะมีค่าความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ก็ต่อเมื่อค่าของ F-value ที่ได้จากโปรแกรมต้องมากกว่าค่า F-value ที่ได้จากการเปิดตารางสถิติ ผลการวิเคราะห์พบว่าค่า F-value ที่ได้จากโปรแกรม (ตารางที่ 4) มีค่าเท่ากับ 108.003 โดยค่า F-value ที่เปิดจากตารางสถิติมีค่าเท่ากับ 2.07 ($F_{0.05,9,50}$) เมื่อกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) เป็น 0.05 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสมการถดถอยมีความเหมาะสม (Du, et al., 2012; Singh, et al., 2011; Liu, et al., 2004; Khajeh and Zadeh, 2012)

อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ซึ่งประเมินได้จากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.951 แสดงให้เห็นว่าร้อยละ 90.51 ของข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถเข้ากันได้กับข้อมูลที่ได้จากการทำนายของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ เนื่องจากค่า R^2 เป็นค่าสัดส่วนดังนั้นจึงมีค่าได้ตั้งแต่ 0 ถึง 1 เท่านั้น เมื่อค่า R^2 เข้าใกล้ 1 แสดงว่าความแปรผันใน Y เกือบทั้งหมดสามารถอธิบายได้โดยตัวแปร X หรือสมการถดถอยมีความถูกต้องในการพยากรณ์ตัวแปร Y ได้ดี ดังนั้นกล่าวได้ว่าผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งมีอิทธิพลจากตัวแปรร้อยละ 90.51 ส่วนอีกร้อยละ 9.49 เป็นผลมาจากตัวแปรอื่นที่ไม่สามารถควบคุมได้ ในทำนองเดียวกันค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่มีการปรับแก้ (Adjusted R^2) ที่ได้จากการวิเคราะห์ในตารางที่ 4 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.947 หรือเข้าใกล้ 1 จึงเป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมนั่นเอง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าความสมบูรณ์ (lack of fit) เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบค่าความพอดีของตัวแบบจำลองเมื่อค่าที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด ($p > 0.05$) แสดงในตารางที่ 4 ค่า p-value ของ lack of fit คือ 0.981 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการที่ 2 มีความน่าเชื่อถือและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวแบบในการอธิบายผลการศึกษาที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้น (Khajeh & Zadeh, 2012; Yetilmezsoy, et al., 2009)



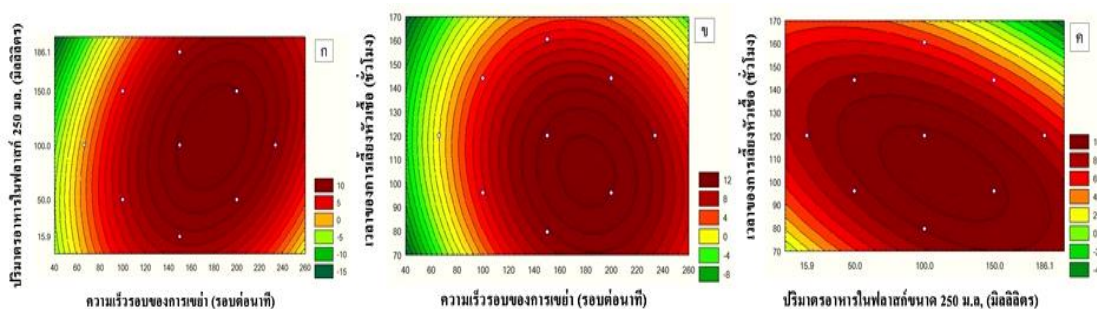
ตารางที่ 4 การทดสอบความแปรปรวนและความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	p-value
Regression	786.881	9	87.431	108.003	0.000 ^a
Residual	40.476	50	0.810		
Lack of fit	0.000	1	0.000	0.001	0.981
Pure error	0.654	45	0.015		
$R^2 = 0.951$					
adjusted $R^2 = 0.947$					

กำหนดให้ a แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.4 ผลของอันตรกิริยาของตัวแปรต่อการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

จากข้อมูลในตารางที่ 2 ผลของอันตรกิริยาระหว่างตัวแปรซึ่งวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistica เวอร์ชัน 7 แสดงผลออกมาในรูปของกราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ ดังรูปที่ 1 กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ เป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจอันตรกิริยาระหว่าง 2 ปัจจัยได้เป็นอย่างดี จุดที่อยู่ในพื้นที่ที่วงกลมวงในสุดเป็นจุดที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดถึงเข้าหิมะโดยอันตรกิริยาระหว่างความเร็วรอบของการเขย่าประมาณ 178 รอบต่อนาทีและปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 105 มิลลิลิตร ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด (รูปที่ 1 ก) แสดงอันตรกิริยาระหว่างความเร็วรอบของการเขย่าประมาณ 178 รอบต่อนาทีและเวลาของการเลี้ยงหัวเชื้อที่ 106 ชั่วโมง ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด (รูปที่ 1 ข) แสดงอันตรกิริยาระหว่างปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 105 มิลลิลิตรและเวลาของการเลี้ยงหัวเชื้อที่ 106 ชั่วโมง ให้ค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุด (รูปที่ 1 ค)



รูปที่ 1 กราฟเส้นโครงร่าง 2 มิติ (contour plot) ของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัวแปรที่มีผลต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งของการเจริญของเห็ดถึงเข้าหิมะโดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ก) ความสัมพันธ์ของความเร็วของการเขย่าและปริมาณอาหารในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ข) ความสัมพันธ์ของความเร็วของการเขย่าและเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ ค) ความสัมพันธ์ของปริมาณอาหารใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรกับเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ

3.5 การยืนยันผลแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้น (สมการที่ 2) ว่าสามารถนำ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้มาใช้ในการทำนายค่าของน้ำหนักเส้นใยแห้งได้หรือไม่ จึงได้นำสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละตัวแปรมาทำการทดลองซ้ำ ได้ทั้งหมด 6 การทดลอง พร้อมทั้งได้เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองจริงและค่าที่ได้จากการคาดคะเน ของสมการถดถอยเพื่อยืนยันผลของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเห็ดถึงเข้าหิมะโดยพิจารณาผลจากน้ำหนักเส้นใยแห้ง สามารถสรุปได้ว่าผล



ของสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของถั่วงอกแช่หิมะคือความเร็วรอบในการเขย่า 178.9 รอบต่อนาที ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 105 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ คือ 106 ชั่วโมง ให้น้ำหนักเส้นใยแห้งสูงสุดที่ 14.03 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 การคาดคะเนผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งกับปัจจัยที่คัดเลือกจากพื้นที่ผิวตอบสนอง

สิ่งทดลองที่	ระดับของปัจจัย			รหัสของปัจจัย			ผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งจากการคาดคะเน	ผลของน้ำหนักเส้นใยแห้งจากการทดลอง
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₁	X ₁		
1	167.4	105	96	0.348	0.10	-1	13.44	12.63
2	167.4	105	106	0.348	0.10	-0.58	13.82	13.27
3	178.9	105	96	0.348	0.10	-1	13.62	13.63
4	178.9	105	106	0.348	0.10	-0.58	13.93	14.03
5	190.5	105	96	0.348	0.10	-1	13.51	13.20
6	190.5	105	106	0.348	0.10	-0.58	13.74	13.29

X1 คืออัตราการเขย่า (รอบต่อนาที) X2 คือปริมาณอาหาร (มิลลิลิตร) X3 คือเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ (ชั่วโมง)

3.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของถั่วงอกแช่หิมะ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่วงอกแช่หิมะ (รูปที่ 2) ลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเพาะเชื้อพบว่าเส้นใยมีสีขาวฟู (รูปที่ 2 ก) และจากการศึกษาบน slide culture พบว่าโครงสร้างเป็นเส้นใยแตกแขนง และมีผนังกัน (septate hypha) เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบคอร์นินโดสปอร์ (conidiospore) มีรูปร่างเป็นท่อนรูปรี (รูปที่ 2 ข) เกิดที่ปลายของเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ (conidiophore) ซึ่งที่ปลายของเส้นใยนี้จะมีเซลล์ที่เรียกว่า sterigma ทำหน้าที่สร้าง conidia การศึกษาสัณฐานวิทยารูปร่างของดอกเห็ดที่เจริญบนหนอนใหม่ที่อายุ 20 วัน ดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อนความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร ลักษณะรูปร่างคล้ายปากการังมีคอร์นินโดสปอร์สีขาวปกคลุมมากมาย (รูปที่ 2 ค และ ง) ทั้งนี้ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ (Ban, et al., 1998)



รูปที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดถั่วงอกแช่หิมะ ก) ลักษณะเส้นใยบนหน้าอาหาร PDA ข) ลักษณะของคอร์นินโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ค) รูปร่างของดอกเห็ดที่เจริญบนหนอนใหม่ ที่อายุ 20 วัน ง) ดอกเห็ดถั่วงอกแช่หิมะเพาะเลี้ยงบนผักแต้ใหม่ บรรจุในขวดแก้ว



สรุปผลการศึกษา

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนองและใช้การวางแผนการทดลองแบบ CCD ที่นำมาใช้เพื่อหาสภาวะความเหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของกระบวนการผลิตเห็ดถั่งเช่าหิมะโดยมีตัวแปรที่นำมาศึกษาและส่งผลกระทบต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งของเห็ดถั่งเช่าหิมะ 3 ตัวแปร คือความเร็วรอบของการเขย่าปริมาตรอาหารในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อจากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าหิมะ คือความเร็วรอบของการเขย่าที่ 178.9 รอบต่อนาที ปริมาตรอาหารปริมาตร 105 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 106 ชั่วโมง สามารถผลิตเส้นใยคิดเป็นน้ำหนักแห้งสูงสุดถึง 14.03 กรัมต่อลิตร และในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเส้นใยในจานเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง PDA พบว่าเส้นใยมีสีขาวฟู ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยโดยวิธี slide culture ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบคอนิไดโอสปอร์ (conidiospore) มีรูปร่างเป็นท่อนรูปรีเจริญอยู่บน conidiophore ส่วนดอกเห็ดถั่งเช่าหิมะที่เจริญบนดักแด้ใหม่จะมีความยาวของดอกเห็ดอยู่ระหว่าง 2-3 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อนลักษณะรูปร่างคล้าย ปาการัง มีคอนิไดโอสปอร์สีขาวปกคลุมเมื่อทำการเลี้ยงโดยใช้แสงเป็นเวลา 20 วัน

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. Association of official Analytical Chemists. Inc. : Washington D.C.
- Ban, K. W., Park, D. K., Shim, J. O., Lee, Y. S., Park, C. H., Lee, J. Y., & Lee, M. W. (1998). Cultural Characteristics for Inducing Fruiting-body of *Isaria japonica*. *The Korean Journal of Mycology*. 26(3), 380-386.
- Che, J. H., Yun, J. W., Cho, E. Y., Kim, S. H., Kim, Y. S., Kim, W. H., & Kang, B. C. (2014). Toxicologic assessment of *Paecilomyces tenuipes* in rats: Renal toxicity and mutagenic potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 70(2), 527-534.
- Chen, X. M., Lu, J. X., Zhang, Y. D., He, J. T., Guo, X. Z., Tian, G. Y., Jin, L. Q. (2008). Studies of macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 43(3), 252-256.
- Du, L., Song, J., Wang, H., Li, P., Yang, Z., Meng, L., & Teng, L. (2012). Optimization of the fermentation medium for *Paecilomyces tenuipes* N45 using statistical approach. *African Journal of Microbiology Research*. 6(32), 6130-6141.
- Kang, P. D., Sung, G. B., Kim, K. Y., Kim, M. J., Hong, I. P., & Ha, N. G. (2010). Breeding of a silkworm variety for synnemata production of *Isaria tenuipes*. *Mycobiology*. 38(3), 180-183.
- Khajeh, M., & Zadeh, F. M. (2012). Response surface modeling of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of benzene, toluene and xylenes in water samples: Box-Behnken design. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 89(1), 38-43.
- Kim, H. C., Choi, B. S., Sapkota, K., Kim, S., Lee, H. J., Yoo, J. C., & Kim, S. J. (2011). Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*. *Process Biochemistry*. 46(8), 1545-1553.
- Liang, D., Zhang, N., Zhang, Y., Zhang, T., Lü, L., Wang, Z., & Teng, L. (2012). Response Surface Methodology Used for Statistical Optimization of Fermentation Media of *Cordyceps militaris*. *Information Technology and Agricultural Engineering*. 13(4), 485-491.



- Liu, H. L., Lan, Y. W., & Cheng, Y. C. (2004). Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology. *Process Biochemistry*. 39(12), 1953–1961.
- Lu, R., Miyakoshi, T., Tian, G. Y., Yoshida, T. (2007). Structural studies of *Paecilomyces tenuipes* Samson polysaccharide–part–2. *Carbohydrate Polymer*. 67(3), 343–346.
- Nam, S. H., Li, C. R., Li, Z. Z., Fan, M. Z., Kang, S. W., Lee, K. G., Yeo, J. H., Hwang, J. S., Choi, J. Y., Han, S. M., Lee, K. M. (2011). Long-term preservation, regeneration, and cultivation of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (Ascomycetes), an entomopathogenic fungus inoculated into the silkworm larva of *Bombyx mori*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13(1) 83–91.
- Öztürk, T., Ustun, G., & Aksoy, H.A. (2010). Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: optimization by response surface methodology. *Bioresource Technology*. 101(19), 7456–7461.
- Park, J. H, Park, N.S., Lee, S.M., & Park, E. (2011). Effect of Dongchunghacho Rice on Blood Glucose Level, Lipid Profile, and Antioxidant Metabolism in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Food Science and Biotechnology*. 20(4), 933–940.
- Singh, K. P., Gupta, S., Singh, A. K., & Sinha, S., (2011). Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modelling approach. *Journal of Hazardous Materials*. 186(2), 1462–1473.
- Xu, C. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., Yun, J. W. (2003). Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochemistry*. 38, 1025–1030.
- Xu, C. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., & Yun, J. W. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*. 97(5), 770–777.
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S., & Vanderbei, R. J. (2009). Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box–Behnken experimental design. *Journal of Hazardous Materials*. 171, 551–562
- Zhu, J. S., Halpern, G. M., & Jones, K. (1998). The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 4, 289–303.