



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*)  
การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยง  
และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า

Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) Productivity,  
Utilization of Secondary Metabolites in Fish Culture and  
Mushroom Loaf Management

โดย

ชัยสิทธิ์ ปรีชา	Chasit Preecha
มณี ศรีชนะนันท์	Manee Srichanun
กิตติชนม์ อุเทนะพันธ์	Kittichon U-taynapun
อรพิน รัตนสุภา	Orapin Rattanasupa

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
ได้รับการสนับสนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2559-2560

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*)  
การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยง  
และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า

Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) Productivity,  
Utilization of Secondary Metabolites in Fish Culture and  
Mushroom Loaf Management

โดย

ชัยสิทธิ์ ปรีชา	Chasit Preecha
มณี ศรีชนันท์	Manee Srichanun
กิตติชนม์ อุเทนะพันธ์	Kittichon U-taynapun
อรพิน รัตนสุภา	Orapin Rattanasupa

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
ได้รับการสนับสนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2559-2560

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ เป็นโครงการที่ได้รับงบประมาณจากโครงการวิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ระยะเวลา 2 ปี เป็นชุดโครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า มีจุดประสงค์ของโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด ทราบต้นทุนการผลิตในการเพาะเห็ดแครงเชิงการค้าเปรียบเทียบกับระหว่างกากมะพร้าวและรำข้าวละเอียด ศึกษาอัตราส่วน ขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครง ศึกษาองค์ประกอบของกลุ่มสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง ในตัวทำลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ศึกษาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การเป็นสารต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านมะเร็ง และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ ศึกษาผลต่อความคุ้มโรคติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจ (*in vivo*) ศึกษากระบวนการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน crude glucan bio-nanoparticle จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง ศึกษาประสิทธิภาพของ crude glucan bio-nanoparticle ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล ศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่ามาผลิตก๊าซชีวภาพ ศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่ามาผลิตน้ำหมักชีวภาพ และศึกษาผลของการใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าเป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช

โครงการนี้ได้รับความร่วมมือด้วยดีจากทุกฝ่ายโดยเฉพาะ โครงการย่อยทั้ง 4 โครงการ และขอขอบคุณ กลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตเห็ดเศรษฐกิจในจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่อำนวยความสะดวกในการออกสำรวจแหล่งข้อมูลในการเพาะเห็ดแครงเพื่อการค้าในจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ได้สนับสนุนสถานที่ และให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนการสนับสนุนงบประมาณจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้คำแนะนำ คณะผู้วิจัยจะนำผลการศึกษาจากโครงการครั้งนี้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่เกษตรกรผู้ผลิตเห็ดแครงและผู้สนใจ

ท้ายที่สุด คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบพระคุณคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยตลอดโครงการ ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ให้การประสานงานด้วยดีตลอดเวลา ทำให้งานโครงการวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินโครงการนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัยสิทธิ์ ปรีชา และคณะ  
กันยายน 2561

## การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยง และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า

ชัยสิทธิ์ ปรีชา<sup>1</sup> มณี ศรีชนะนันท์<sup>1</sup> กิตติชนม์ อุเทนพะพันธุ์<sup>1</sup> และอรพิน รัตนสุภา<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

ชุดโครงการวิจัยเรื่อง การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยง และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า ประกอบด้วยโครงการย่อย 4 โครงการ วัตถุประสงค์ของชุดโครงการ การนำสิ่งเหลือทิ้งทางการผลิตเห็ดแครงยังสามารถนำมาแยกสารกลุ่ม glucan ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำขณะที่ก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่หมดอายุการใช้งานในฟาร์ม ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรยังมีความเป็นไปได้ ที่จะใช้เป็นตัวกระตุ้นในการผลิตก๊าซชีวภาพ น้ำหมักชีวภาพ รวมทั้งเป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืชเป็นการกำจัดของเสียในฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถช่วยลดต้นทุนให้กับเกษตรกรได้ พบว่า ก้อนเชื้อเห็ดเก่าและกากมะพร้าวสามารถนำมาทดแทนได้ โดยมีต้นทุนต่ำสุดและมีรายได้สูงสุด จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและสัตว์น้ำ 2 ชนิดคือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าสารสกัดเห็ดแครง รวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำละลายด้วยตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ แสดงให้เห็นว่าเห็ดแครงไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ประสิทธิภาพของ crude glucan ในการเพิ่มความต้านทานของปลาไนต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. veronii* พบว่าปลาไนที่ฉีดด้วย crude glucan มีอัตราการรอดตายสูงสุด ตามด้วย yeast glucan และ PBS ตามลำดับ และการใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าเป็นตัวกระตุ้นในการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์จาก มูลไก่ มูลวัว และ มูลสุกร ได้เนื่องจากให้ผลใกล้เคียงกันทั้งเวลาเริ่มต้นในการเกิดก๊าซชีวภาพ จำนวนวันที่เกิดก๊าซชีวภาพ และ ปริมาตรก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น สำหรับเชื้อ พด.2 ให้ค่าต่ำ ส่วนชุดควบคุม (ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ใดๆ) ให้ค่าต่ำที่สุดทั้ง จำนวนวันที่เกิดก๊าซชีวภาพ และ ปริมาตรก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น แต่ใช้เวลาเริ่มต้นในการเกิดก๊าซชีวภาพมากที่สุด และพบว่าสามารถใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืชได้โดยพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ ผักกวางตุ้ง และ มะเขือเปราะ เจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่สุดในสิ่งทดลองที่ 1 และสิ่งทดลองที่ 4

**สำคัญ:** การผลิตเห็ดแครง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสารอนุภาคนาโนชีวภาพ  
กลูแคน ก๊าซชีวภาพและสารสกัดชีวภาพ

<sup>1</sup> คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ. พังสง จ. นครศรีธรรมราช 80110



เรื่อง	สารบัญ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ		(ก)
บทคัดย่อ		(ข)
สารบัญ		(ค)
บทที่ 1 บทนำ		1
หลักการและเหตุผล		1
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย		2
ขอบเขตการศึกษา		2
โครงการย่อยที่ 1		2
โครงการย่อยที่ 2		2
โครงการย่อยที่ 3		3
โครงการย่อยที่ 4		3
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย		4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ		4
รายละเอียดชุดโครงการวิจัย		5
เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย		6
เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด		7
เป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด		7
แผนการบริหารแผนงานวิจัยและแผนการดำเนินงาน		8
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย		13
โครงการย่อยที่ 1		13
โครงการย่อยที่ 2		20
โครงการย่อยที่ 3		29
โครงการย่อยที่ 4		34
บทที่ 3 สรุปผลการดำเนินการโครงการวิจัย		37
โครงการย่อยที่ 1		37
โครงการย่อยที่ 2		39
โครงการย่อยที่ 3		40
โครงการย่อยที่ 4		44
เอกสารอ้างอิง		45
ภาคผนวก		49

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. หลักการและเหตุผล

เห็ดจัดอยู่ในอาณาจักร Fungi เป็นเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ และรักษาสมดุลในระบบนิเวศน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดแครงมีความสามารถในการย่อยสลายเนื้อไม้ และมีประโยชน์ต่อชีวิตประจำวันของมนุษย์ในแง่ของอาหารและยาป้องกันรักษาโรค ประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมสำหรับการเพาะเห็ดหลายชนิดประกอบกับต้นทุนในการผลิตเห็ดแต่ละชนิดค่อนข้างต่ำ จึงทำให้ผู้เพาะเห็ดมีรายได้ดี มีฐานะความเป็นอยู่ดีขึ้น ซึ่งจะส่งผลไปถึงฐานะทางเศรษฐกิจของชาติด้วย (กรมอาชีวศึกษา, 2552) ดังนั้นถ้าได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรไทยได้รู้จักการเพาะเลี้ยงเห็ดที่ถูกต้อง นอกจากจะทำให้มีผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นทั้งด้านปริมาณและคุณภาพแล้วยังเป็นการเพิ่มอาหารที่มีคุณค่าแก่ประชากรส่วนใหญ่ของประเทศ พร้อมทั้งจะพัฒนาประเทศชาติได้ในทุกทางโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านเศรษฐกิจ เพราะเมื่อผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นรายได้ของเกษตรกรก็จะเพิ่มขึ้นด้วย จากการจำหน่ายผลผลิตทั้งในประเทศและส่งออกเป็นสินค้าออก ซึ่งเป็นผลให้ระบบเศรษฐกิจของชาติเจริญก้าวหน้าและพัฒนาขึ้นตามลำดับ (ปัญญา, 2552)

ประเทศผู้ผลิตเห็ดทั่วโลกพบว่า ประเทศที่มีการพัฒนาเทคนิค วิธีการ และระบบการเพาะเห็ดที่สำคัญจนเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปมีเพียง 5 ประเทศเท่านั้นคือ 1) ประเทศจีน (ไต้หวัน) สามารถผลิต เห็ดแชมปิยองหรือเห็ดฝรั่งส่งออกมากที่สุด 2) ประเทศญี่ปุ่น สามารถผลิตเห็ดหอมได้มากที่สุด 3) ประเทศเกาหลีใต้ สามารถผลิตเห็ดแชมปิยองและ เห็ดหอม 4) ประเทศอินเดียสามารถผลิตเห็ดนางรมและเห็ดนางนวล 5) ประเทศไทย สามารถผลิตเห็ดฟางส่งเป็นสินค้าออกเป็นอันดับหนึ่งของโลกรองลงมาได้แก่ เห็ดนางรม เห็ดเป่าฮื้อ เห็ดนางฟ้าเห็ดหูหนู และเห็ดแครง ซึ่งแหล่งผลิตเห็ดที่สำคัญของไทยส่วนใหญ่อยู่ในเขตกรุงเทพมหานครบริเวณชานเมือง และจังหวัดใกล้เคียง เช่น จังหวัดนครปฐมสมุทรสาคร และปทุมธานี ส่วนทางภาคเหนือแหล่งผลิตเห็ดที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง ส่วนมากจะผลิตเห็ดที่ชอบอากาศค่อนข้างเย็น เช่น เห็ดหอม เห็ดแชมปิยอง และเห็ดเป่าฮื้อ เป็นต้น (สำเนา, 2557)

เห็ดเป็นอาหารพื้นบ้านที่มีคุณค่าทางโภชนาการมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย เกลือแร่สูง สามารถผลิตสารกลุ่ม polysaccharide ที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ schizophyllan (Reyes *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีสารทุติยภูมิที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน รวมถึงการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (นฤมล, 2557; Mirfat *et al.*, 2010; Teoh & Mat Don, 2013; Mirfat *et al.*, 2014; Naz, 2014) เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก เป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ทั่วโลกและพบได้ตลอดปีในช่วงที่มีความชื้นพอ พบขึ้นอยู่กับวัสดุหลายชนิด เช่น ท่อนไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ใบหญ้า ในภาคใต้ของไทยพบมากบนท่อนไม้ยางพารา เห็ดแครงเป็นเห็ดที่สามารถเพาะได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้วัสดุเพาะที่มีความหลากหลายสามารถเก็บรักษาเห็ดสดได้ทนนาน โดยคงรูป คงรส และกลิ่น ทำแห้งเก็บได้นานไม่เน่าเสีย อีกทั้งมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับเห็ดนางรม นางฟ้า เห็ดฟางที่มีขายในท้องตลาด ราคาจำหน่ายดอกสด กิโลกรัมละ 80-150 บาท เห็ดแห้งกิโลกรัมละ 400-500 บาท จากการที่ต้นทุนในการผลิตเห็ดแครงที่ค่อนข้างต่ำ และผลผลิตที่ได้ในปริมาณสูง รวมถึงมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการป้องกัน รักษาโรคสัตว์น้ำ รวมถึงเป็นสารเสริมสุขภาพสัตว์น้ำที่มีราคาถูก เพื่อหลีกเลี่ยงการนำเข้าหรือสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตอาหารปลอดภัย และเป็นการใช้ผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ ให้เกิดประโยชน์ร่วมกัน

นอกจากนี้สิ่งเหลือทิ้งทางการผลิตเห็ดแครงยังสามารถนำมาแยกสารกลุ่ม glucan ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำขณะที่ก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่าที่หมดอายุการใช้งานในฟาร์ม ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรยังมีความเป็นไปได้ ที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซชีวภาพ น้ำหมักชีวภาพ รวมทั้งเป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืชเป็นการกำจัดของเสียในฟาร์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถช่วยลดต้นทุนให้กับเกษตรกรได้

## 2. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด
2. เพื่อทราบต้นทุนการผลิตในการเพาะเห็ดแครงเชิงการค้าเปรียบเทียบกับระหว่างกากมะพร้าวและรำข้าวละเอียด
3. ศึกษาอัตราส่วน ขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครง
4. ศึกษาองค์ประกอบของกลุ่มสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน
5. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การเป็นสารต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ
6. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านมะเร็ง และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ
7. เพื่อศึกษาผลต่อความคุ้มโรคติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจ (*in vivo*)
8. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน crude glucan bio-nanoparticle จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง
9. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ crude glucan bio-nanoparticle ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล
10. เพื่อศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่ามาผลิตก๊าซชีวภาพ
11. เพื่อศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่ามาผลิตน้ำหมักชีวภาพ
12. เพื่อศึกษาผลของการใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่าเป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช

## 3. ขอบเขตการศึกษา

### โครงการย่อยที่ 1: การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด

พัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียดที่เพาะเลี้ยงในถุงและสามารถหาอัตราส่วนขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครงเพื่อให้ผลผลิตเห็ดแครงมีคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดและผู้บริโภคมากที่สุดและลดต้นทุนในการผลิตพร้อมทั้งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกรเกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการเพาะเห็ดเพื่อการค้าได้จริง

### โครงการย่อยที่ 2: การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในการศึกษาจะเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ในการสกัดสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงที่ได้จากวัสดุเพาะทั่วไป สารสกัดที่ได้จะนำไปแยกกลุ่มสาร และทำการวิเคราะห์ตามกรรมวิธีทางเคมี เช่น partition, TLC, HPLC เป็นต้น



สารสกัดหยาบ พร้อมทั้งสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เป็น major components ที่ได้จากขั้นตอนแรก จะนำไปทดสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ เช่น การเป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง ความสามารถในการกักเก็บน้ำ และการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ ซึ่งจะนำไปสู่ข้อสรุปในการใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิของเห็ดแครงในกระบวนการผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีคุณภาพต่อไป

### โครงการย่อยที่ 3: การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง (*Shizophyllum commune*) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว

ศึกษาวิธีการสกัด และประสิทธิภาพการสกัด crude glucan จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งแต่ของเกษตรกรที่ผ่านการเก็บดอกเห็ดแล้ว รวมถึงเห็ดแครงที่ขึ้นใหม่จากก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง โดยเปรียบเทียบสัดส่วนที่เหมาะสมจากวิธีการสกัด 2 รูปแบบ ได้แก่ Hot water extraction และ Alkaline extraction ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีสกัดจะมุ่งเน้น 3 ประเด็นหลักได้แก่ 1) วิธีการที่ง่าย 2) ต้นทุนต่ำเหมาะสมแก่การพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม และ 3) ผลผลิต crude glucan ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล ทั้งในแง่ของการแสดงออกของยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและการทำงานของเม็ดเลือดและสารสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเปรียบเทียบกับ glucan ทางการค้า หลังจากนั้นจะพัฒนา crude glucan ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ bio-nanoparticle โดยจะประเมินประสิทธิภาพของ crude glucan bio-nanoparticle ด้วยความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล จะใช้รูปแบบในการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ รวมถึงประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลกระทบของ bio-nanoparticle ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลที่ได้รับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เพื่อประเมินความปลอดภัยในการใช้ bio-nanoparticle ในการเพาะเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ต่อไป

### โครงการย่อยที่ 4: การใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช

ศึกษาวิธีการสกัด และประสิทธิภาพการสกัด crude glucan จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งแต่ของเกษตรกรที่ผ่านการเก็บดอกเห็ดแล้ว รวมถึงเห็ดแครงที่ขึ้นใหม่จากก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง โดยเปรียบเทียบสัดส่วนที่เหมาะสมจากวิธีการสกัด 2 รูปแบบ ได้แก่ Hot water extraction และ Alkaline extraction ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีสกัดจะมุ่งเน้น 3 ประเด็นหลักได้แก่ 1) วิธีการที่ง่าย 2) ต้นทุนต่ำเหมาะสมแก่การพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรม และ 3) ผลผลิต crude glucan ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล ทั้งในแง่ของการแสดงออกของยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและการทำงานของเม็ดเลือดและสารสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเปรียบเทียบกับ glucan ทางการค้า หลังจากนั้นจะพัฒนา crude glucan ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสมให้อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ bio-nanoparticle โดยจะประเมินประสิทธิภาพของ crude glucan bio-nanoparticle ด้วยความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล จะใช้รูปแบบในการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ รวมถึงประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลกระทบของ bio-nanoparticle ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลที่ได้รับผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เพื่อประเมินความปลอดภัยในการใช้ bio-nanoparticle ในการเพาะเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ต่อไป



#### 4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย:

การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียดที่เพาะเลี้ยงในถุง และสามารถหาอัตราส่วนขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครงเพื่อให้ผลผลิตเห็ดแครงมีคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดและผู้บริโภคมากที่สุดและลดต้นทุนในการผลิตพร้อมทั้งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการเพาะเห็ดเพื่อการค้าได้จริง

การศึกษาจะเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ในการสกัดสารทุติยภูมิจากเห็ดแครงที่ได้จากวัสดุเพาะทั่วไป สารสกัดที่ได้จะนำไปแยกกลุ่มสาร และทำการวิเคราะห์ตามกรรมวิธีทางเคมี เช่น partition, TLC, HPLC เป็นต้น สารสกัดหยาบ พร้อมทั้งสารกึ่งบริสุทธิ์ที่เป็น major components ที่ได้จากขั้นตอนแรก จะนำไปทดสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น การเป็นสารต้านแบคทีเรีย สารต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง ความสามารถในการควบคุมโรค และการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ ซึ่งจะนำไปสู่ข้อสรุปในการใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิของเห็ดแครงในกระบวนการผลิตสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีคุณภาพต่อไป

การสกัด และประสิทธิภาพการสกัด Crudeglucan จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งของเกษตรกรที่ผ่านการเก็บดอกเห็ดแล้ว โดยเปรียบเทียบสัดส่วนที่เหมาะสมจากวิธีการสกัด 3 รูปแบบ ได้แก่ Hot water extraction Alkaline extraction และ Acidic extraction ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีสกัดจะมุ่งเน้นวิธีการที่ง่าย ต้นทุนต่ำเหมาะแก่การพัฒนาต่อยอดในระดับอุตสาหกรรมและผลผลิต crude glucan ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล ทั้งในแง่ของการแสดงออกของยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันและการทำงานของเม็ดเลือดและสารสารถ้านในระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* โดยเปรียบเทียบกับ glucan ทางการค้า และจะเป็นการพัฒนา crude glucan bio-nanoparticle จาก crude glucan ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการที่เหมาะสม ในการเพาะเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ต่อไป

เกษตรกรประกอบอาชีพเพาะเห็ด ต้องประสบปัญหาการกำจัดวัสดุเหลือทิ้ง หรือ ขยะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่หมดอายุแล้วซึ่งมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ อย่างเป็นฟาร์มที่อยู่ใกล้เมืองยิ่งหาที่ทิ้งยากจะกองไว้ทำปุ๋ยหมักก็กลัวเชื้อรา เชื้อโรคหรือแมลงที่มีอยู่ในก้อนเชื้อเห็ดเก่ากลับมาระบาดในโรงเรือนเพาะดอกเห็ดเป็นปัญหาของเกษตรกรอย่างมาก หากสามารถนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่หมดอายุแล้วมาใช้ประโยชน์ในการผลิตก๊าซชีวภาพ ซึ่งเป็นพลังงานทางเลือกเพื่อหมุนกลับมาใช้ในฟาร์มตลอดจนในครัวเรือนซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายของฟาร์มให้ต่ำลง นอกจากนี้นำก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่หมดอายุแล้วมาทำน้ำหมักชีวภาพมาใช้ประโยชน์ได้ ส่วนการนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่หมดอายุแล้วมาใช้ปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืชก็ทำให้เกษตรกรได้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังเป็น การกำจัดขยะจากการเพาะเห็ดได้อีกด้วย

#### 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงาน ที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัย

1. ทราบสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด
2. ทราบต้นทุนการผลิตในการเพาะเห็ดแครงเชิงการค้าเปรียบเทียบระหว่างกากมะพร้าวและรำข้าวละเอียด
3. ทราบอัตราส่วน ขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครง

4. ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีขั้นพื้นฐานของสารสกัดหยาบ และสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่เห็ดแคร่งสร้างขึ้น ภายใต้เงื่อนไขของชนิดของตัวทำละลายที่ต่างกัน
5. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิที่เห็ดแคร่งสร้างขึ้นต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ
6. ทราบถึงประสิทธิภาพในความคุ้มโรคติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจ เพื่อเป็นทางเลือกในการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีต่าง ๆ เพื่อลดการนำเข้า และลดการปนเปื้อนในอาหารมนุษย์
7. พัฒนาการความรู้ใหม่ในการสร้างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ชนิด Bio-nanoparticle จากวัสดุเหลือใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดแคร่ง
8. ลดของเสียและเพิ่มมูลค่าของก้อนเห็ดเหลือทิ้งจากการเลี้ยงเห็ดแคร่งของเกษตรกร
9. เพิ่มขีดความสามารถในการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด glucan ในปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย
10. ได้ผลงานที่นำไปใช้ในการประชุมวิชาการหรือการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารในประเทศ
11. เกษตรกรที่เพาะเห็ดสามารถนำเอาวัสดุเหลือทิ้งจากฟาร์มกลับมาใช้ประโยชน์ได้
12. เกษตรกรสามารถลดต้นทุนการผลิตได้

## 6. รายละเอียดชุดโครงการวิจัย

### 6.1 ชื่อแผนงานวิจัย

**ภาษาไทย:** การเพิ่มผลผลิตเห็ดแคร่ง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแคร่งในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า

**ภาษาอังกฤษ:** Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) Productivity, Utilization of Secondary Metabolites in Fish Culture and Mushroom Loaf Management

### 6.2 ชื่อโครงการวิจัยย่อย

โครงการวิจัย	ชื่อโครงการวิจัย	หัวหน้าโครงการ
โครงการวิจัยย่อยที่ 1	การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแคร่งในถุงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด Bag Cultivation of Split Mushroom ( <i>Schizophyllum commune</i> ) by Application Coconut Meal Substitute Rice Bran	ผศ.ชัยสิทธิ์ ปรีชา
โครงการวิจัยย่อยที่ 2	การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแคร่ง ( <i>Schizophyllum commune</i> ) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ The Utilization of Secondary Metabolites from Split Mushroom ( <i>Schizophyllum commune</i> ) as Anti-microbial Agents and Immunostimulant in Aquaculture	ดร. มณี ศรีชนะนันท์

โครงการวิจัย	ชื่อโครงการวิจัย	หัวหน้าโครงการ
โครงการวิจัยย่อยที่ 3	การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง ( <i>Shizophyllum commune</i> ) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว Development of Crude Glucan Bio-nanoparticle from Mycelium Byproduct of Split Gill Mushroom ( <i>Shizophyllum commune</i> ) Production as an Immunostimulant in Nile Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) (เสนอของบประมาณประจำปี 2559– 2560)	ดร.กิตติชนม์ อุเทนะพันธ์
โครงการวิจัยย่อยที่ 4	การใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช The Reuse of Split Mushroom ( <i>Shizophyllum commune</i> ) Spawn for Biogas and Bioextract Production Including Soil Property Improvement for Planting (เสนอของบประมาณประจำปี 2559– 2560)	ผศ. อรพิน รัตนสุภา

## 7. เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

### 7.1 ระดับยุทธศาสตร์ชาติ

1. การพัฒนากระบวนการผลิตสินค้าเกษตรที่มีคุณภาพ เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตสินค้าเกษตร ให้มีความเข้มแข็ง และมั่นคง
2. การเพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพการผลิตภาคเกษตร รวมถึงการเพิ่มขีดความสามารถทางการตลาดของสินค้าเกษตร

### 7.2 ระดับมหาวิทยาลัย

1. การวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการบริหารจัดการด้านการเกษตร
2. การวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลผลิตทางการเกษตร
3. การวิจัยเพื่อตอบสนองความต้องการของชุมชน
4. การวิจัยเพื่อช่วยให้เกษตรกรมีความรู้ความสามารถเพิ่มขึ้น
5. การวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพด้านการเกษตรให้กับเกษตรกร

### 7.3 ระดับจังหวัด

1. พัฒนาการผลิตภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม
2. พัฒนาการพืชเศรษฐกิจในจังหวัดและภาคใต้
3. เป็นการพัฒนาศักยภาพด้านการผลิตของกลุ่มเกษตรกร เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิต และการพัฒนาที่ยั่งยืนต่อไป

## 8. เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

8.1 เป้าหมาย ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตเห็ดแครงเป็นอันดับหนึ่งของโลก

8.2 ผลผลิตและตัวชี้วัด

ผลผลิต	ตัวชี้วัด
	รวมเมื่อสิ้นสุดโครงการวิจัย (พ.ศ. 2559-2560)
1. เกษตรกรกลุ่มเพาะเห็ด มีความรู้เกี่ยวกับการพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครง และการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตสัตว์น้ำ	30 %
2. มีเครือข่ายผู้ผลิตเห็ดที่ได้มาตรฐานและมีการรวมกลุ่มผู้ผลิตเชิงอุตสาหกรรม	2 กลุ่ม
3. เพิ่มโอกาสและศักยภาพในการผลิตเห็ดแครง และผลิตสัตว์น้ำของเกษตรกรมีรายได้สูงขึ้น	50 %
4. พัฒนาคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การเป็นสารต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ สารต้านมะเร็ง และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจที่ได้มาตรฐานในระดับนานาชาติ	20 %
5. การผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน crude glucan bio-nanoparticle จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล	1 ผลิตภัณฑ์
6. การพัฒนาการนำของก้อนเชื้อเห็ดแครงมาผลิตก๊าซชีวภาพ และน้ำหมักชีวภาพเพื่อใช้ในการปลูกพืช	2 ผลิตภัณฑ์
7. มีการพัฒนาของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตเห็ดแครง และผลิตสัตว์น้ำในจังหวัดนครศรีธรรมราช ทั้งในส่วนภาคการผลิต การตลาด	8 องค์ความรู้
8. มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่หลังจากสิ้นสุดโครงการ	4 คน
9. มีการเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการ บทความในสื่อสิ่งพิมพ์ สื่อวิทยุ และโทรทัศน์	4 เรื่อง

## 9. เป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด

9.1 มีข้อมูลพื้นฐานเพื่อพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด

9.2 เพื่อทราบต้นทุนการผลิตในการเพาะเห็ดแครงเชิงการค้าเปรียบเทียบระหว่างกากมะพร้าวและรำข้าวละเอียดในอัตราส่วน ซีลี้อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าว

สด: กากมะพร้าวแห้ง: ภูมิท์: ดีเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครง

9.3 ทราบองค์ประกอบของกลุ่มสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน

9.4 ทราบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การเป็นสารต้านแบคทีเรีย และต้านเชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ในการเป็นสารต้านมะเร็ง และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเศรษฐกิจ (*in vivo*)

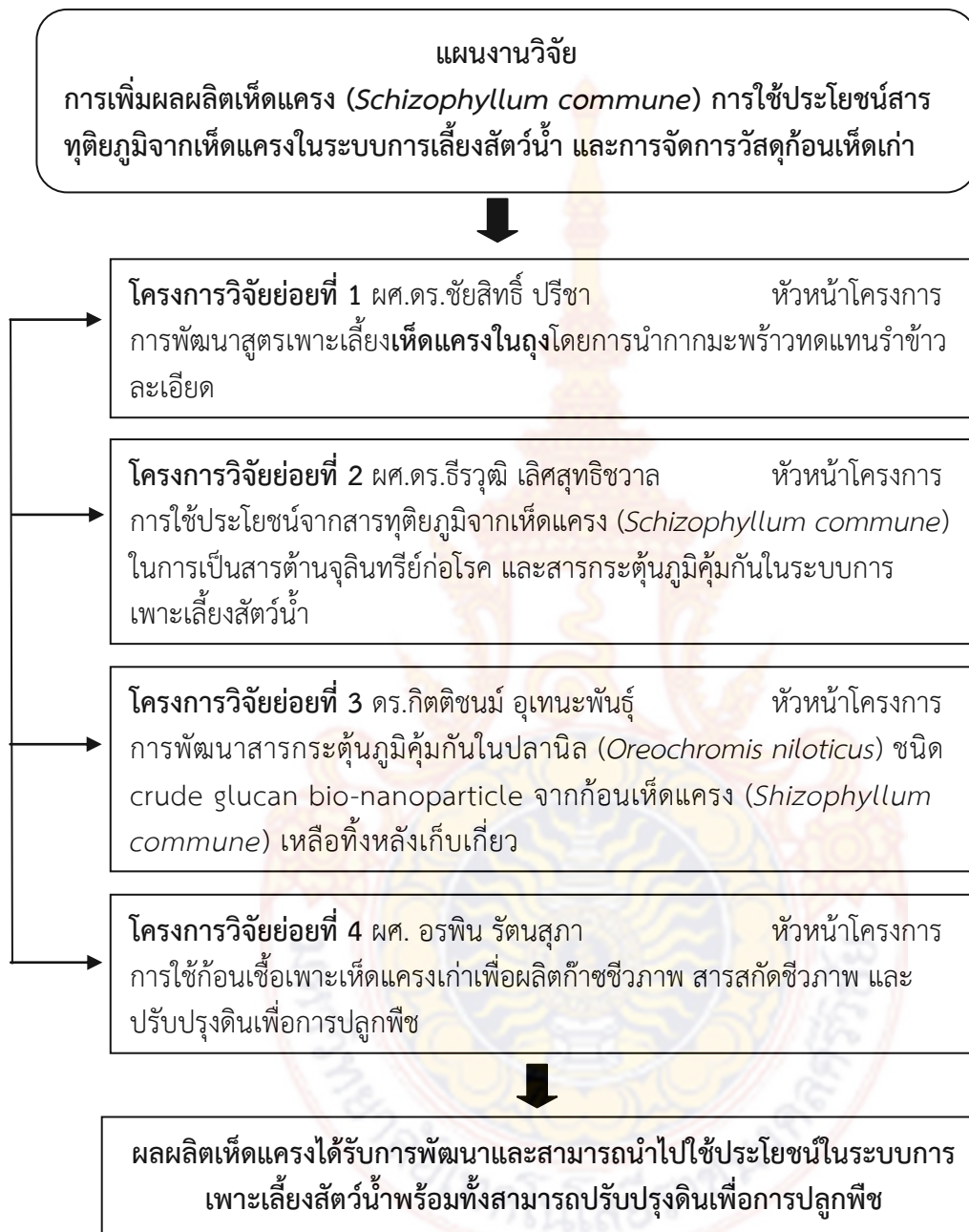
9.5 เพื่อศึกษากระบวนการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน crude glucan bio-nanoparticle จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล

9.6 เพื่อศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเห็ดแครงมาผลิตก๊าซชีวภาพน้ำหมักชีวภาพเพื่อใช้ในการปลูกพืช



10. แผนการบริหารแผนงานวิจัยและแผนการดำเนินงาน พร้อมทั้งขั้นตอนการดำเนินงาน ตลอดแผนงานวิจัย และโปรตรระบบการบริหารความเสี่ยง (ถ้ามี)

10.1 แผนการบริหารแผนงานวิจัย



## 10.2 แผนการดำเนินงานแผนงานวิจัย

โครงการวิจัย	ปี 2559		ปี 2560	
	1-6	7-12	1-6	7-12
<b>แผนงานวิจัยเรื่อง:</b> การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง ( <i>Schizophyllum commune</i> ) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า	←————→			
1. การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด	←————→			
2. การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง ( <i>Schizophyllum commune</i> ) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	←————→			
3. การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาชนิด ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง ( <i>Shizophyllum commune</i> ) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว	←————→			
4. การใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช	←————→			



## 10.3 ขั้นตอนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย

โครงการวิจัย	กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการ
<p><b>แผนงานวิจัยโครงการชุดเรื่อง:</b> การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (<i>Schizophyllum commune</i>) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. เสนอโครงการวิจัย</li> <li>2. สำรวจพื้นที่เพื่อทำการทดลอง</li> <li>3. ดำเนินการเก็บข้อมูลรอบที่ 1</li> <li>4. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1</li> <li>5. วิเคราะห์ผลการวิจัย</li> <li>6. สรุปผลการดำเนินงานประจำปี</li> <li>7. ดำเนินการเก็บข้อมูลรอบที่ 2</li> <li>8. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1</li> <li>9. วิเคราะห์ผลการวิจัย</li> <li>10. ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์</li> </ol>	<p>กรกฎาคม 2559 ตุลาคม 2559 ตุลาคม 2559–กุมภาพันธ์ 2560 มีนาคม 2559 สิงหาคม 2559 กันยายน 2559 ตุลาคม 2559–กุมภาพันธ์ 2560 มีนาคม 2560 สิงหาคม 2560 กันยายน 2560</p>
<p><b>โครงการวิจัยย่อยที่ 1</b> การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุ้งโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. เตรียมการ และเก็บรวบรวมแหล่งการเพาะเห็ดแครงเพื่อการค้า และเกิดในธรรมชาติ พร้อมทั้งสำรวจวัสดุที่ใช้เพาะเห็ด</li> <li>2. การเตรียมหัวเชื้อเห็ดแครง</li> <li>3. เตรียมกากมะพร้าวสดและกากมะพร้าวแห้ง</li> <li>4. เพาะเห็ดแครงโดยวิธีการเพาะในถุ้งพลาสติก</li> <li>5. เปิดดอกสำหรับเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในถุ้งพลาสติก</li> <li>6. บันทึกข้อมูลและเก็บเกี่ยวผลผลิต</li> <li>7. วิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารที่มีในดอกเห็ดแครง</li> <li>8. จำหน่ายผลผลิต</li> <li>9. คำนวณหาต้นทุนและผลตอบแทนของการเพาะเห็ดแครง</li> <li>10. ทำแบบสอบถามความพึงพอใจของผู้บริโภค</li> <li>11. วิเคราะห์และสรุปผล</li> <li>12. สรุปรายงานประจำปี ที่ 1</li> </ol>	<p>ตุลาคม 2559  ตุลาคม 2559 มกราคม–ธันวาคม 2560  มกราคม–ธันวาคม 2560  มกราคม–กันยายน 2560 มกราคม–กันยายน 2560 มกราคม–กันยายน 2560 มกราคม–กันยายน 2560 มกราคม–กันยายน 2560  กรกฎาคม 2560  สิงหาคม 2560 กันยายน 2560</p>

โครงการวิจัย	กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการ
<p><b>โครงการวิจัยย่อยที่ 2</b> การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (<i>Schizophyllum commune</i>) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. วางแผนการดำเนินการ รวมทั้งจัดสรรงบประมาณ จัดซื้ออุปกรณ์ สารเคมี จัดจ้างผู้ช่วยนักวิจัย</li> <li>2. การสกัดสารเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ โดยตัวทำละลายต่าง ๆ การทำ TLC เพื่อประเมินความเข้มข้นของสารเคมีทุติยภูมิ</li> <li>3. การสกัดสารกึ่งบริสุทธิ์ / บริสุทธิ์และวิเคราะห์องค์ประกอบระดับโมเลกุล โครงสร้างทางสเตอริโอเคมี</li> <li>4. การทดสอบประสิทธิภาพ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา</li> <li>5. วิเคราะห์ผล วิจารณ์ สรุปและเขียนรายงาน</li> <li>6. สรุปรายงานประจำปี ที่ 1</li> </ol>	<p>ตุลาคม 2559</p> <p>มกราคม-ธันวาคม 2559</p> <p>มกราคม-ธันวาคม 2560</p> <p>มกราคม-กันยายน 2560</p> <p>กันยายน 2560</p> <p>กันยายน 2560</p>
<p><b>โครงการวิจัยย่อยที่ 3</b> การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาไนล ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง (<i>Schizophyllum commune</i>) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. การจัดเตรียมข้อมูล และเตรียมอุปกรณ์</li> <li>2. การดำเนินการทดลอง การทดลองที่ 1</li> <li>3. การดำเนินการทดลอง การทดลองที่ 2</li> <li>4. การดำเนินการทดลอง การทดลองที่ 3</li> <li>5. การดำเนินการทดลอง การทดลองที่ 4</li> <li>6. ทดสอบประสิทธิภาพสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาไนล (<i>Oreochromis niloticus</i>) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง (<i>Schizophyllum commune</i>) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว</li> <li>7. การวิเคราะห์ข้อมูล</li> <li>8. สรุป เขียนรายงานการวิจัยประจำปี ที่ 1</li> </ol>	<p>ตุลาคม 2559</p> <p>มกราคม-ธันวาคม 2560</p> <p>มกราคม-ธันวาคม 2560</p> <p>มกราคม-ตุลาคม 2560</p> <p>มกราคม-ตุลาคม 2560</p> <p>มกราคม-ตุลาคม 2560</p> <p>กันยายน 2560</p> <p>กันยายน 2560</p>
<p><b>โครงการวิจัยย่อยที่ 4</b> การใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. เตรียมการ และ เก็บรวบรวมก้อนเชื้อเห็ดเก่าจากฟาร์มเห็ดในจังหวัดนครศรีธรรมราช</li> <li>2. ย่อยก้อนเชื้อเห็ดเก่า</li> <li>3. วิเคราะห์สมบัติ และธาตุอาหารพืชในก้อนเชื้อเห็ดเก่า</li> <li>4. เก็บและเตรียมตัวอย่างดิน</li> <li>5. วิเคราะห์สมบัติและธาตุอาหารพืชในดิน</li> <li>6. ทดลองเรื่องการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเก่า</li> </ol>	<p>ตุลาคม 2559</p> <p>ธันวาคม 2559</p> <p>มกราคม-ธันวาคม 2560</p> <p>มกราคม-กันยายน 2560</p> <p>มกราคม-กันยายน 2560</p> <p>มกราคม-กันยายน 2560</p>



โครงการวิจัย	กิจกรรม	ระยะเวลาดำเนินการ
	ผลิตก๊าซชีวภาพ 7. ทดลองเรื่องการใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่า ผลิตสารสกัดชีวภาพ 8. ทดลองเรื่องการใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่า ปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช 9. วิเคราะห์และสรุปผล 10. สรุปรายงานประจำปี 1	มกราคม-กันยายน 2560  มกราคม-กันยายน 2560  สิงหาคม 2560 กันยายน 2560



## บทที่ 2

### วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 โครงการวิจัยย่อยที่ 1 การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

#### 1. วัสดุอุปกรณ์

1. มันฝรั่ง
2. ผงวุ้น
3. น้ำตาล traxtose
4. น้ำสะอาด
5. เมล็ดข้าวฟ่าง
6. เชื้อมเห็ญ
7. หม้อนึ่งความดัน
8. ตู้เขี่ยเชื้อ
9. หม้อนึ่งแบบลูกทุ่ง
10. โรงเรือนเพาะเห็ด
11. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
12. ขวดอาหาร
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. มีดผ่าตัด
15. แอลกอฮอล์ 75%
16. ถุงร้อนขนาด 6.5 X 10 นิ้ว
17. คอขวดแบบประหยัด
18. สำลี หรือผ้าฝ้ายปั่น
19. ซ้อนตัก
20. พลั่ว
21. pH miter
22. เครื่องชั่งละเอียด

#### 2. แผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แบ่งเป็น 4 การทดลองดังต่อไปนี้

**การทดลองที่ 1:** การศึกษาประสิทธิภาพการเพาะเห็ดแครงในถุงโดยการศึกษาอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าวอบแห้งเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวสดต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง มีจำนวน 9 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง แต่ละสิ่งทดลองสามารถแจกแจงรายละเอียดไว้ (ตารางที่ 6) ดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป
- สิ่งทดลองที่ 2: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 3: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 4: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 5: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 6: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 7: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 8: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 9: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 6** สูตรเพาะเห็ดแครงในถุงโดยการศึกษาอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าวอบแห้งเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวสด

สูตร	วัสดุหลัก (%)	วัสดุเสริมทดแทนรำข้าวละเอียด (%)	วัสดุเสริมอื่นๆ (%)
1	ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100	รำข้าวละเอียด 100	ภูไมท์ 2 ดีเกลือ 0.2 น้ำสะอาด 80
2		กากมะพร้าวอบแห้ง 100	
3		กากมะพร้าวอบแห้ง 75 + รำข้าวละเอียด 25	
4		กากมะพร้าวอบแห้ง 50 + รำข้าวละเอียด 50	
5		กากมะพร้าวอบแห้ง 25 + รำข้าวละเอียด 75	
6		กากมะพร้าวสด 100	
7		กากมะพร้าวสด 75 + รำข้าวละเอียด 25	
8		กากมะพร้าวสด 50 + รำข้าวละเอียด 50	
9		กากมะพร้าวสด 25 + รำข้าวละเอียด 75	

**การทดลองที่ 2:** การศึกษาประสิทธิภาพการเพาะเห็ดแครงถุงโดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ มีจำนวน 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง แต่ละสิ่งทดลองสามารถแจกแจงรายละเอียดไว้ (ตารางที่ 7) ดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป ใช้ขี้เลื่อยใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 2: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 3: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 4: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์

สิ่งทดลองที่ 5: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 7** สูตรอาหารการเพาะเห็ดแครง *Schizophyllum commune* โดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่

สูตร	วัสดุหลัก (%)	วัสดุเสริม (%)	วัสดุเสริมอื่นๆ (%)
1	ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100	รำข้าวละเอียด 100	ภูไมท์ 2 ดีเกลือ 0.2 น้ำสะอาด 70-80
2	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า 100		
3	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า 75 + ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 25		
4	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า 50 + ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 50		
5	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า 25 + ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 75		

**การทดลองที่ 3:** การศึกษาประสิทธิภาพการเพาะเห็ดแครงถุงโดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ และการใช้การมะพร้าวสดทดแทนรำข้าวละเอียด มีจำนวน 11 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง แต่ละสิ่งทดลองสามารถแจกแจงรายละเอียดไว้ (ตารางที่ 8) ดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป (ขี้เลื่อยใหม่) 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 2: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 3: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 4: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 5: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 6: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 7: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 8: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 9: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 10: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 11: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์



**ตารางที่ 8** สูตรอาหารการเพาะเห็ดแครง *Schizophyllum commune* โดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำข้าวละเอียด

สูตร	วัสดุหลัก (%)		วัสดุเสริม (%)		ส่วนผสมอื่นๆ (%)
	ขี้เลื่อยไม่ย่างพารา	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	รำข้าวละเอียด	กากมะพร้าวสด	
1	100	0	0	100	ภูไม้ 2 ดิบเกลือ 0.2 น้ำสะอาด 70-80
2	0	100	0	100	
3	75	25	75	25	
4	75	25	50	50	
5	75	25	25	75	
6	50	50	75	25	
7	50	50	50	50	
8	50	50	25	75	
9	25	75	75	25	
10	25	75	50	50	
11	25	75	25	75	

**การทดลองที่ 4:** การศึกษาประสิทธิภาพการเพาะเห็ดแครงสูงๆโดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ และการใช้การมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด มีจำนวน 11 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง แต่ละสิ่งทดลองสามารถแจกแจงรายละเอียดไว้ (ตารางที่ 9) ดังนี้

- สิ่งทดลองที่ 1: สูตรอาหารเพาะเห็ดแครงทั่วไป (ขี้เลื่อยใหม่) 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 2: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 100 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 3: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 4: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 5: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 25 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 6: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 7: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์

- สิ่งทดลองที่ 8: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 9: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 25 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 10: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 50 เปอร์เซ็นต์
- สิ่งทดลองที่ 11: วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ 75 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำ 75 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 9** สูตรอาหารการเพาะเห็ดแครง *Schizophyllum commune* โดยการใช้วัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ ร่วมกับการใช้กากมะพร้าวตากแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด

สูตร	วัสดุหลัก (%)		วัสดุเสริม (%)		ส่วนผสมอื่นๆ (%)
	ขี้เลื่อยไม่ย่างพารา	ก้อนเห็ดเก่า	รำข้าวละเอียด	กากมะพร้าวอบแห้ง	
1	100	0	0	100	ภูไม้ที่ 2 ดิบเกลือ 0.2 น้ำสะอาด 70-80
2	0	100	0	100	
3	75	25	75	25	
4	75	25	50	50	
5	75	25	25	75	
6	50	50	75	25	
7	50	50	50	50	
8	50	50	25	75	
9	25	75	75	25	
10	25	75	50	50	
11	25	75	25	75	

**หมายเหตุ** การเตรียมกากมะพร้าวที่ใช้ในการศึกษาเป็นกากมะพร้าวสดควรนำมาจากการคั้นกะทิ ในรูปกากสด คือนำมาจากการคั้นใหม่ๆ ยังไม่มีการบูดหรือเน่าเสีย และกากมะพร้าวแห้ง โดยการนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผ่านการทำให้แห้งโดยใช้เครื่องอบ เพื่อการลดกลิ่นหืน และลดการปนเปื้อนได้ ให้แห้งจนเหลือความชื้นประมาณร้อยละ 14-16 แล้วจึงนำไปทดลอง (นฤมล และคณะ, 2556; สุเนตรา และคณะ, 2556)

### 3. วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เก็บรวบรวมแหล่งการเพาะเห็ดแครงเพื่อการค้าในจังหวัดนครศรีธรรมราช เห็ดแครงที่เกิดในธรรมชาติ พร้อมทั้งสำรวจวัสดุที่ใช้เพาะเห็ด สูตรอาหารในการเพาะเห็ดของแต่ละพื้นที่ การเกิดดอกเห็ดในธรรมชาติในรอบปี รวบรวมปัญหาที่เกษตรกรประสบในการเพาะเห็ดแครง พร้อมเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดแครงที่พบตามธรรมชาติ และสายพันธุ์เห็ดแครงที่ฟาร์มเห็ดของเกษตรกรที่ใช้เพาะ ทั้งนี้สอบถามราคาต้นทุนกำไร และค่าตอบแทนของการเพาะเห็ดแครง

## 2. การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

เลี้ยงเส้นใยเห็ดเห็ดแครงบนอาหาร พี ดี เอ เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่ จึงทำการย้ายเส้นใยเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่าง โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำไว้ 1 คืน ต้มหรือนึ่งให้สุก เทน้ำทิ้ง เกลี่ยและตากไว้ให้หมาด นำเมล็ดข้าวฟ่างกรอกใส่ขวดแบน ประมาณ 2/3 ของขวด ปิดด้วยจุกสำลีและกระดาษ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นจึงเขี่ยหัวเชื้อเห็ดลงไปเพาะเลี้ยง รोजนเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างใช้เวลาประมาณ 10-15 วัน จึงเดินเต็มวัสดุเพาะ นำไปเพาะลงในวัสดุเพาะในถุงพลาสติกต่อไป

## 3. การเพาะเห็ดแครงโดยวิธีการเพาะในถุงพลาสติก ใช้สูตรอาหาร ซึ่งประกอบด้วย

ซีลี้อยไม้ยางพารา	100	กิโลกรัม
รำละเอียด หรือปลายข้าว	50	กิโลกรัม
กูโมท์	2	กิโลกรัม
ดีเกลี้อย	0.2	กิโลกรัม
น้ำสะอาด	75-80	กิโลกรัม

โดยนำหนักผสมให้เข้ากัน ใส่น้ำลงไปให้มีความชื้นประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ ไม่ให้แห้งหรือเปียกเกินไป ทดสอบโดยการใช้มือกำซีลี้อย หากคลายมือออก ซีลี้อยจับกันเป็นก้อนหลวมๆ พอดี แสดงว่าใช้ได้ แต่ถ้าซีลี้อยกระจายร่อนออกให้เติมน้ำลงไปจนพอดี บรรจุใส่ถุงร้อนพับกันประมาณ 500 กรัมต่อก่อนเว้นปากถุงไว้สำหรับสวมคอขวดพลาสติกเพื่อการเขี่ยเชื้อภายหลังยกถุงกระทุ้งเบาๆ เพื่อให้ซีลี้อยแน่นหรืออาจใช้มือกดลงไปให้แน่นรวบปากถุงและใช้คอขวดสวมลงไป ใช้มือตึงถุงให้ตึงแล้วรวบปากถุงลงมาด้านนอกใช้ยางรัดให้แน่นก็จะทำให้ปากถุงก่อนเชื้อแคบลงมีขนาดเท่ากับคอขวด และคงรูปร่าง เพื่อใช้สำหรับเขี่ยเชื้อเห็ดลงไปใช้ไม้เจาะเป็นรูสี่กลวงไปประมาณ 5 เซนติเมตร อุดด้วยสำลี หุ้มด้วยกระดาษแล้วรัดด้วยยาง หรืออาจใช้ฝาครอบสำลีแทนกระดาษก็ได้เพื่อไม่ให้สำลีเปียกเวลานึ่ง

การนึ่งฆ่าเชื้อในขั้นตอนการเพาะเห็ดเมื่อเตรียมถุงก่อนเชื้อเสร็จเรียบร้อย ให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที (ขึ้นกับลักษณะของหม้อและปริมาณก้อนเชื้อ) หรือนึ่งด้วยหม้อนึ่งแบบลูกทุ้งใช้เวลา 3-4 ชั่วโมง ไฟแรงสม่ำเสมอ หลังจากนั้นเรียบร้อยแล้วนำก้อนเชื้อออกมาวางเรียงกัน รोजนกระทั่งก้อนเชื้อเย็น จึงสามารถเขี่ยหัวเชื้อจากเมล็ดข้าวฟ่างต่อไปได้

วางก้อนเชื้อเรียงกันเป็นแถว ให้สามารถทำงานได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว เปิดเอากระดาษที่หุ้มสำลีอยู่ออก แต่ยังไม่ต้องเปิดจุกสำลี และระวังไม่ให้สำลีหลุดออกจากคอขวด ควรเช็ดมือด้วยแอลกอฮอล์ นำเอาขวดหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างที่คัดเลือกไว้แล้ว ใช้มือเขย่าในขณะที่ยังปิดจุกสำลีอยู่เพื่อให้เมล็ดข้าวฟ่างกระจายดีเสียก่อน ถอดจุกสำลีที่ขวดเมล็ดข้าวฟ่างออก นำปากขวดไปลงไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ ในช่วงนี้ถ้าเมล็ดข้าวฟ่างในขวดยังไม่รวน จะใช้ช้อนตักเข้าไปในขวด เพื่อเขี่ยเมล็ดข้าวฟ่างในขณะที่ปากขวดยังลงไปอยู่ก็ได้ ในมืออีกข้างหนึ่งเปิดจุกสำลีก่อนเชื้อ แล้วเทหัวเชื้อลงไปลงในถุงประมาณ 15-20 เมล็ด จากนั้นจึงรีบปิดจุกสำลีทันที อาจไม่ต้องใช้กระดาษปิดทับ แต่ควรแน่ใจว่าอุดจุกสำลีได้แน่นพอ ถุงต่อไปก็ทำเช่นเดียวกัน ทุก 3-4 ถุงควรลงปากขวดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ครั้งหนึ่ง หัวเชื้อที่เปิดขวดออกมาแล้วควรใช้ให้หมด หากมีเหลือไม่ควรนำมาใช้ต่อไปอีก เพราะหัวเชื้ออาจเสียได้ เฉลี่ยแล้วหัวเชื้อหนึ่งขวด จะใช้เขี่ยเชื้อลงถุงได้ประมาณ 50-60 ถุง ช้อแนะนำสำหรับการปฏิบัติงานควรใช้คนที่ชำนาญ อย่างน้อย 2 คนช่วยกัน โดยคนหนึ่งคอยเปิดจุกสำลีอีกคนหนึ่งก็เทเชื้อจะทำให้สะดวกขึ้นนำเข้าโรงเรือนบ่มเพาะ เห็ดแครง บ่มเส้นใยในสภาพมืดสลัวที่

อุณหภูมิห้อง ในเวลาประมาณ 15-20 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มถ่วง ซึ่งหลังจากเส้นใยเต็มถ่วงจึงให้แสงในโรงบ่ม ซึ่งแสงจะกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกจะสังเกตเห็นเส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจึงนำไปเปิดดอก

การเปิดดอก เมื่อเส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจึงนำไปเปิดดอกโดยดึงจุดสำลีและคอขวดด้านบนออก ใช้ยางรัดปิดปากถุงให้แน่นแล้วกรีดด้านข้างให้เป็น มุมเฉียงจากบนลงล่างทั้ง 4 มุมของถุงหรือจะกรีดเป็น 4 แผล แล้วนำไปแขวนในโรงเรือน การรดน้ำ ควรจะติดระบบสปริงเกอร์ ให้น้ำเข้าและเย็นหากรดน้ำมากเกินไป ก้อนเห็ดจะดูดน้ำเข้าไปทำให้ก้อนเชื้อเสียและปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น

#### 4. การบันทึกข้อมูล

1. การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) หลังใส่หัวเชื้อ โดยวัดความยาวของก้อนที่เชื้อเห็ดจากคอก้อนจนถึงก้นของก้อนเพาะเชื้อทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง วัดทุกๆ 7 วัน

2. ผลผลิตรวมทั้งหมด โดยชั่งน้ำหนักจำนวนดอกเห็ดของแต่ละบาดแผล ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง

3. จำนวนดอก โดยนับจำนวนดอกเห็ดของแต่ละก้อน จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง (สุ่มเก็บจำนวนดอกเห็ดทั้งหมด 20 ถุง)

4. ความยาวดอก โดยสุ่มวัดความยาวของดอกของแต่ละก้อน จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง (สุ่มเก็บจำนวนดอกเห็ดทั้งหมด 20 ถุง)

5. ความกว้างดอก โดยสุ่มวัดความกว้างของดอกของแต่ละก้อน จำนวน 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง (สุ่มเก็บจำนวนดอกเห็ดทั้งหมด 20 ถุง)

6. วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของก้อนเชื้อเห็ดก่อนและหลังการเพาะเห็ดทำการทดลอง 4 ซ้ำ

7. หาเปอร์เซ็นต์ก้อนเสีย ก่อนและหลังการเปิดดอกของก้อนเห็ดแครงและเก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุที่พบ

8. คำนวณหาต้นทุนและผลตอบแทนการเพาะเห็ดแครงในอัตราส่วนของกากมะพร้าวสดต่อกากมะพร้าวแห้งและอัตราส่วนรำข้าวละเอียดในแต่ละการทดลอง

9. วิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนที่มีในดอกเห็ดแครงของแต่ละสิ่งทดลอง

#### 5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

#### 6. สถานที่ทำการทดลอง

โรงเรือนเพาะเห็ด สาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช 1 09 หมู่ 2 ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช



2.2 โครงการวิจัยย่อยที่ 2 การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

### 1. การเตรียมตัวอย่างเห็ดแครง

นำเศษเหลือเห็ดแครงที่เหลือจากการตัดแต่งก่อนจำหน่าย ที่ได้จากสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ซึ่งทำการเพาะโดยใช้ก้อนเห็ดที่เตรียมทำจากการใช้สูตรขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม รำละเอียด 50 กิโลกรัม ภูไมซ์ 2 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.2 กิโลกรัม น้ำ 80 ลิตร

นำเห็ดแครงที่รวบรวมได้ ล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง นำมาหั่นให้ละเอียด เพื่อเตรียมการสกัดตามหัวข้อต่อไป

## 2. กระบวนการสกัดสารสกัดจากเห็ดแครง

### 2.1 การสกัดหยาบ

นำเห็ดแครงอบแห้งที่เตรียมไว้ มาแช่สกัดในตัวทำละลายจำนวน 6 ชนิด คือ น้ำ, 100% methanol, 95% ethyl alcohol, ethyl acetate, dichloromethane และ hexane ในอัตราส่วนน้ำหนักตัวอย่าง (กิโลกรัม) ต่อปริมาตรตัวทำละลาย (ลิตร) 1: 2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง นำกากมาแช่ซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมอีกจนกว่าจะได้สารละลายสกัดใส เพื่อให้การสกัดเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารสกัด (ของเหลว) ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่แห้งที่สุด แล้วคำนวณผลผลิตที่ได้จากการสกัดเห็ดแครงที่ได้จากสารสกัดแต่ละชนิด เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ภาชนะปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป (Natarajan *et al.*, 2005)

## 3. การศึกษาองค์ประกอบขั้นพื้นฐานทางเคมีของสารสกัดหยาบ

3.1 นำสารสกัดหยาบในแต่ละชั้น วิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง Thin Layer Chromatography (TLC) ละลายสิ่งสกัดในแต่ละตัวทำละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 0.5 มิลลิกรัม: ตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วเล็ก (vial) ใช้หลอดคาปิลลารี (capillary) ดูดสารละลายสิ่งสกัดหยาบแต้มลงบนแผ่น TLC รอจนแห้ง นำไปแยกแถบสารในตัวทำละลายอินทรีย์ที่กำหนด (mobile phase) เมื่อเคลื่อนที่ตามที่กำหนดแล้วเอาออกจากตัวทำละลายอินทรีย์ (mobile phase) ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้เครื่อง Ultraviolet (UV) (Lambomed, รุ่น UV-VIS Auto, UV-2602) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร พบด้วย Anisaldehyde ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนสังเกตสีที่เกิดขึ้น เพื่อให้ทราบกลุ่มของสารที่มีอยู่ในสิ่งสกัดหยาบ

3.2 การวิเคราะห์ด้วย High-performance liquid chromatography (HPLC) หลังจากสกัดสารด้วยวิธีการสกัดหยาบแล้วจากนั้นนำมาวิเคราะห์การแยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลวเป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และปริมาณ (quantitative analysis) โดยสามารถวิเคราะห์เพื่อบอกชนิดของสารและปริมาณของสารเบื้องต้นได้และใช้กับงานด้านต่างๆ อย่างกว้างขวาง เพื่อแสดงผลออกมาเป็น chromatogram

### 3.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดแครง

วิธีที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธี DPPH radical Scavenging activity, วิธี Scavenging activity of ABTS radical และวิธี Metal chelating activity โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 3.3.1 วิธี DPPH radical Scavenging activity

การตรวจวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล DPPH<sup>•</sup> โดยดัดแปลงจากวิธีของ (Shimada *et al.*, 1992) เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช (DPPH<sup>•</sup>, diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วง ซึ่งสามารถทดสอบได้โดยการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0000, 0.0125, 0.0250, 0.0500 และ 0.1000 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เมื่อ DPPH<sup>•</sup> ได้รับ Hydrogen atom จากสารสกัดเห็ดแครงที่ใช้ในการทดสอบ สารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ BHT เป็น standard control นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ % การยับยั้ง (% inhibition) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{A_{517\text{control}} - A_{517\text{sample}}}{A_{517\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ  $A_{517\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายควบคุม (ตัวทำละลาย + DPPH)

$A_{517\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + DPPH)

#### 3.3.2 วิธี Scavenging activity of ABTS radical

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS<sup>•+</sup>, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ดัดแปลงตามวิธีการของ Re *et al.*, (1999) โดยการผสมสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 35.5 ไมโครลิตร ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะได้ Stock ABTS radical cation ที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ก่อนนำมาทำการทดลองจะต้องเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.70±0.05 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน) เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.0000, 0.0125, 0.0250, 0.0500 และ 0.1000 ppm ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ผสมกับสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เมื่ออนุมูลอิสระได้รับ Hydrogen atom จากสารสกัดเห็ดแครงที่ใช้ในการทดสอบ จะทำให้สี ABTS<sup>•+</sup> จางลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และใช้ trolox เป็น standard control นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % การยับยั้ง ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{A_{734\text{control}} - A_{734\text{sample}}}{A_{734\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ  $A_{734\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (ABTS<sup>•+</sup> ที่เจือจางแล้ว)

$A_{734\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + ABTS<sup>•+</sup>)

### 3.3.3 วิธี Metal chelating activity

เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบความสามารถในการแย่งจับโลหะไอออน ตามวิธีของ Dinis *et al.*, (1994) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่เข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นชุดควบคุม เติมสารละลาย เฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร และเติมเฟอร์โรซีน (Ferrozine) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป จะไปจับกับ Fe<sup>2+</sup> แล้วจะให้สีม่วง และถ้าสารสกัดสาหร่ายมีความสามารถในการแย่งจับโลหะ Fe<sup>2+</sup> จะทำให้สีม่วงจางลง สามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้ EDTA เป็น standard control นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{A_{562\text{control}} - A_{562\text{sample}}}{A_{562\text{control}}} \right) \times 100$$

เมื่อ  $A_{562\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (น้ำกลั่นปราศจากไอออน + FeCl<sub>2</sub> + Ferrozine)

$A_{562\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + FeCl<sub>2</sub> + Ferrozine)

3.4 การวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยส่งตัวอย่างสารสกัดไปวิเคราะห์ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วยเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดคือ

1. HepG2 : Cytotoxicity against human hepatocarcinoma ATCC HB-8065 (มะเร็งตับ)
2. Caco2 : Cytotoxicity against human caucasian colon adenocarcinoma ATCC HTB-37 (มะเร็งลำไส้ใหญ่)
3. KB-Oral cavity cancer : Anti-Cancer (มะเร็งช่องปาก)
4. MCF7-breast cancer : Anti-Cancer (มะเร็งเต้านม)
5. NCI-H187-Small cell lung cancer:Anti-Cancer (มะเร็งปอด)

และเซลล์ใช้หัตถก 1 ชนิด คือเซลล์ NA: Neuraminidase inhibition assay โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติคือ African green monkey kidney : Cytotoxicity against Vero cells (ไตลิง)



#### 4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้วิธี broth dilution method และ disc diffusion method

##### 4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

เชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อจากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ ศุภมาตย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ มาบ่มไว้ในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy agar (TSA) บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมาทำสารละลายด้วยน้ำเกลือ 0.85% ในส่วนของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรีย  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่า Optical density (OD) เท่ากับ 0.15 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ก่อนนำไปทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ

##### 4.2 การเตรียมสารละลายสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 2.1 มาชั่งในปริมาณ 0.1 กรัม ละลายในตัวทำละลาย (ชนิดนั้นๆ) 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงจนเนื้อสารละลาย เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี วิธี broth dilution method และ วิธี disc diffusion method เพื่อคัดเลือกว่าสารสกัดชนิดไหนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลาเศรษฐกิจ โดยเปรียบเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะ ชนิด Oxytetracyclin และ Norfloxacin

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้วิธี broth dilution method และ disc diffusion method

##### I. Broth dilution method สำหรับการศึกษแบคทีเรียก่อโรค

1. การเตรียม stock เตรียมสารสกัดหยาบ ให้ได้ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ ภายใต้วัดละลายที่เหมาะสม ที่ให้ค่าสารทฤษฎีสูงสุด (ตามผลการวิเคราะห์ทางเคมี: HPLC)

2. การทดสอบ นำสารละลายเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้มาใส่ในอาหารเหลว Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สารสกัดหยาบตามปริมาณที่กำหนดจากความเข้มข้นต่ำไปสูง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ประเมินค่าความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ (ESCMID, 2003)

##### II. Disc diffusion method สำหรับการศึกษแบคทีเรีย

1. การเตรียม stock นำสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ เตรียมให้ได้ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก ประมาณ 6-7 ความเข้มข้น โดยวิธี two-fold dilution method

2. การเตรียม sensitivity disc นำสารสกัดที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษทดสอบ ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้ sensitivity disc ที่พร้อมจะใช้งาน

3. การดำเนินการทดลอง นำสารละลายเชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 3.1 -3.2 มาเกลี่ย (swap) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนหน้าอาหารแห้ง วาง sensitivity disc ลงบนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ



inhibition zone (Islam *et al.*, 2008) เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อประเมินค่า MIC

## 5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการออกฤทธิ์ต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา

### 5.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

5.1.1 คัดเลือกชนิดของสารสกัดหยาบจากเห็ดแครงที่ได้ผลผลิต (% yield) ของสารสกัดในปริมาณสูง ประกอบกับชนิดของสารสกัดจากเห็ดแครงที่ให้มีความสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิด ในระดับสูง 4 อันดับแรก เพื่อนำมาใช้ในการผสมในอาหารเพื่อทดสอบในตัวปลาต่อไป โดยคัดเลือกสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยสารสกัด 4 ชนิดคือ น้ำ เมทานอล 2-บิวทานอล และไดคลอโรมีเทน

### 5.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

ทำการสกัดสารสกัดหยาบตามวิธีในข้อ 2.1 และทำแห้งโดยใช้ Rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดหยาบไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปใช้ผสมในอาหารต่อไป

### 5.2 การเตรียมอาหารทดลอง

5.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตอาหารทดลอง และเศษเหลือเห็ดแครง ประกอบด้วยคือ โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) เพื่อใช้ในการคำนวณสูตรอาหาร

### 5.2.2 การเตรียมอาหารทดลอง

#### สูตรอาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 7 สูตร กำหนดให้อาหารมีปริมาณโปรตีนและไขมันเท่ากันที่ระดับ 35% และ 6% ตามลำดับ (มีองค์ประกอบของอาหารทดลองแสดงดังตารางที่ 5) ประกอบด้วย

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสูตรควบคุม (อาหารที่ไม่มีการใช้สารสกัดจากเห็ดแครง) (Control)

อาหารสูตรที่ 2 อาหารผสมเศษเหลือจากเห็ดแครงปน ระดับ 1% (1% NS)

อาหารสูตรที่ 3 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยน้ำ ระดับ 0.5% (0.5% WS)

อาหารสูตรที่ 4 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยเมทานอล ระดับ 0.5% (0.5% MS)

อาหารสูตรที่ 5 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วย 2-บิวทานอล ระดับ 0.5% (0.5% BS)

อาหารสูตรที่ 6 อาหารสารสกัดจากเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน ระดับ 0.5% (0.5% DS)

อาหารสูตรที่ 7 อาหารทางการค้าที่มีระดับโปรตีนใกล้เคียงกับอาหารสูตรควบคุม (Ref)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของอาหารทดลองสำหรับปลาตุก (กรัม/ 100 กรัม อาหาร)

วัตถุดิบ	สูตรควบคุม	1% NS	0.5% WS	0.5% MS	0.5% BS	0.5% DS
ปลาป่น	15	15	15	15	15	15
กากถั่วเหลือง	50	50	50	50	50	50
เศษเหลือหีดยืดเคร่ง	0	1	0	0	0	0
สารสกัดจากหีดยืดเคร่งแต่ละชนิด	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5
รำ	10	10	10	10	10	10
แป้งข้าวเจ้า	12	12	12	12	12	12
แกลบ	7.45	6.45	6.95	6.95	6.95	6.95
น้ำมันพืช	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
วิตามิน/แร่ธาตุผสม <sup>1</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
โคลีนคลอไรด์	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
เกลือ	1	1	1	1	1	1
โมโนแคลเซียมฟอสเฟต <sup>2</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
รวม	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ <sup>1</sup> ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยยูเนียนฟีดมิลล์ จำกัด (มหาชน)

<sup>2</sup> ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไทยลักซ์เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (มหาชน)

### 5.2.3 การผลิตอาหารทดลอง

- เตรียมวัตถุดิบที่มีลักษณะหยาบคือ กากถั่วเหลือง แกลบ และรำ มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโม่ และร่อนผ่านตะแกรงตาถี่
- ชั่งวัตถุดิบอาหารแต่ละชนิดตามสูตรอาหารแต่ละสูตร ใส่ในถุงพลาสติก โดยผลิตอาหารสูตรละ 3 กิโลกรัม
- ผสมส่วนประกอบวัตถุดิบที่มีลักษณะแห้งในกะละมัง โดยผสมด้วยเครื่องผสมแบบแนวอนให้เข้ากัน นาน 15 นาที ผสมสารสกัดหีดยืดเคร่งด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในแป้งข้าวเจ้า เพื่อให้สารสกัดกระจายให้ทั่วอาหาร แล้วผสมในลงในถังผสม จากนั้นเติมน้ำมันพืชแล้วผสมต่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี ประมาณ 10 นาที แล้วจึงเติมน้ำสะอาดประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการผสมต่อจนเป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 10 นาที จึงนำไปอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ดอาหารแบบจม
- นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแวนที่ผ่านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน
- อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง ความชื้นเม็ดอาหารไม่เกิน 10%
- เก็บอาหารทดลองที่ผ่านกระบวนการอบแล้วร่อนเพื่อกำจัดเศษอาหารผงออกไปบรรจุถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- นำอาหารที่เตรียมไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990)

### 5.3 การเตรียมปลาทดลอง และระบบการเลี้ยง

นำลูกพันธุ์ปลาตุ๊กปักอยู่ จากฟาร์มปลาเอกชน ขนาด 3 นิ้วมาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 1 ตัน จำนวน 1 ถัง ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คือ ช่วงเช้า เวลา 08.00 น. และช่วงบ่าย เวลา 16.00 น. อนุบาลจนได้น้ำหนักประมาณ 15 กรัม/ตัว จากนั้น จึงคัดปลาขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 15 ตัว/ตู้ ขึ้นตู้ทดลองขนาดความจุ 100 ลิตร เติมน้ำปริมาตร 80 ลิตร ให้ออกซิเจนตลอดเวลา เพื่อให้ปลาสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการคัดขนาดปลาและชั่งปลาเริ่มต้นโดยคัดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน 12 ตัว/ตู้ ชั่งน้ำหนักปลารายตัว โดยการสลบด้วยน้ำกานพลู ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ บันทึกข้อมูลน้ำหนักเริ่มต้น และหาน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นของปลานิลดำที่ทดลอง ในระหว่างการทดลองให้อาหารโดยให้กินจนอิ่ม และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในสัดส่วน 70% ของน้ำในตู้ ในช่วงบ่ายก่อนการให้อาหาร ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

### 5.4 การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

1. ตรวจสอบพฤติกรรมลักษณะอาการของปลา ในช่วงระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารของปลา และลักษณะผิดปกติภายนอกที่อาจเกิดขึ้น เช่น การเป็นแผลจากการกัดกันเอง การติดเชื้อ เป็นต้น

2. การเจริญเติบโตของปลานิล หลังจากทีปลานิลได้รับอาหารจากการทดลองของแต่ละสูตรที่แตกต่างกัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลา ทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์โดยคำนวณน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น บันทึกจำนวนปลาที่เหลือ เพื่อคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดตาย บันทึกปริมาณการกินอาหารของปลาเพื่อคำนวณหาอัตราการแลกเนื้อและประสิทธิภาพการกินใช้โปรตีน ได้โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}$$

$$\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่ม} = \text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)} = \frac{(\ln \text{ น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} - \ln \text{ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}) \times 100}{\text{จำนวนวันทดลอง}}$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมด (กรัม/ตัว)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)}}$$

5.5 การเก็บตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อการป้องกันภาวะออกซิเดชัน

#### 5.5.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตู้ละ 2 ตัว (ทรีทเมนต์ละ 6 ตัว) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ต่อการป้องกันการภาวะออกซิเดชันในตัวปลา โดยเจาะเลือดปลา และตั้งตัวอย่างเลือดให้เม็ดเลือดตกตะกอน แล้วนำตัวอย่างไปหมუნเหวี่ยง แล้วจึงนำซีรัม มาวิเคราะห์กิจกรรม

เอนไซม์ฟอสฟาเตส (alkaline / acid phosphatase) และกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ และผ่าตัดดับปลาใส่ใน microtube และแช่ในไนโตรเจนเหลว เพื่อวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ และกิจกรรมเอนไซม์คะตาเลส

#### 5.5.2 วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Buege and Aust, 1978) โดยสลบตัวอย่างปลาด้วยน้ำมันกานพลู และผ่าตัดนำเนื้อเยื่อตับของปลาประมาณ 40 มก. ใส่ในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 และบดด้วยแท่งบด (ทำการบดในสภาวะที่เย็นตลอดเวลา) ทำปฏิกิริยากับสารละลาย TBA (0.375 % TBA ที่ละลายใน 15% trichloroacetic acid and 0.25 N HCl) นำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำตัวอย่างให้เย็นโดยผ่านน้ำไหล และนำตัวอย่างหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ TBARS (thiobarbituric reactive substances) ในรูปของ malonaldehyde

#### 2. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase

นำซีรัมของปลาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Alkaline phosphatase ตามวิธีการของ Bessey *et al.* (1946) โดยใช้ 7 mM p-nitro-phenyl-phosphate เป็นซับสเตรท โดยนำตัวอย่างซีรัมผสมกับบัฟเฟอร์ (ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม) ปริมาตร 250  $\mu$ L แล้วทำปฏิกิริยากับซับสเตรทปริมาตร 50  $\mu$ L ใน 96 well plate วัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้วิธีวัดแบบ Kinetic ที่ความยาวคลื่น 407 นาโนเมตร ทุก 20 วินาที นาน 5 นาที นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ p-nitrophenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างซีรัมโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951) และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein) โดย 1 Unit ของเอนไซม์คือปริมาณผลผลิต (p-nitrophenol) ที่ได้ต่อนาที

3. การวัดกิจกรรมเอนไซม์คะตาเลส (Catalase activity) (Trasviña-Arenas *et al.* 2013) สกัดตัวอย่างดับปลาด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 บดด้วยแท่งบดให้ละเอียดภายใต้สภาวะเย็น และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C วัดกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ 96 well-plate โดยเติม potassium phosphate buffer (0.1M, pH 7.0) 100  $\mu$ L และเติม Abs. methanol 30  $\mu$ L แล้วเติมสาร Formaldehyde มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดหุ้มละ 20  $\mu$ L และเติม 40mM hydrogen peroxide 20  $\mu$ L (เตรียมแล้วใช้ทันที) หลังจากนั้นซีลเพลสด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาเติม 10M KOH 30  $\mu$ L จากนั้นเติม 25mM Purpald<sup>®</sup> 30  $\mu$ L seal well plate ด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาเติม 62.5 mM KIO<sub>3</sub> 10  $\mu$ L และ seal well plate ด้วย plastic film นำไป shake บน orbital shaker 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่า OD ที่ 540 nm) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างสารสกัดจากตับโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951) และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein) โดย 1 Unit ของเอนไซม์คือปริมาณผลผลิต formaldehyde 1 nmol ที่ได้ต่อนาที

#### 4. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

วัดกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากพลาสมาตามวิธีการของ (Demers and Bayne, 1997 อ้างโดย Suwannasang *et al.*, 2014) โดยนำพลาสมา 25  $\mu$ L เติมเชื้อ Micrococcus lysodeikticus ปริมาตร 175 mL นำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับ Hen egg white



lysozyme เป็นสารละลายมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951) และรายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (Unit/mg protein)

#### 6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลโดยใช้ Shapiro-Wilk test และความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Levene's test แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 7. สถานที่เก็บตัวอย่างและทำการวิจัย

หน่วยวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช



2.3 โครงการวิจัยย่อยที่ 3 การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง (*Shizophyllum commune*) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

#### 1. แนวทางการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วงการวิจัย โดยงานวิจัยช่วงแรกประกอบด้วย การพัฒนาวิธีการสกัดที่เหมาะสมทั้งในแง่ของปริมาณสาร crude glucan และการคงประสิทธิภาพทางชีวภาพ ซึ่งจะให้ความสำคัญต่อการปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดใน 2 วิธี ได้แก่ Hot water extraction และ Alkaline extraction พร้อมทั้งตรวจสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัด crude glucan ที่แยกได้เพื่อสรุปหากระบวนการสกัดที่เหมาะสม จากนั้นจะทำการสกัด crude glucan ให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปทดสอบในช่วงที่ 2 ของการวิจัย โดยเน้นการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อ crude glucan bio-nanoparticle ที่ผลิตได้ โดยการพันเชื้อหรือผสมอาหารปลาและวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล ทั้งในแง่ของ gene expression, การทำงานของเม็ดเลือดขาวและสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันใน serum รวมทั้งอัตราการรอดตายของปลานิลเมื่อได้รับเชื้อแบคทีเรีย *A. hydrophila*

#### 2. การทดลองที่ 1 การศึกษาวิธีการสกัด crude glucan จากก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง

##### 2.1 ตัวอย่างก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยวและปลานิลทดลอง

ก้อนเห็ดแครงที่นำมาศึกษาในครั้งนี้จะได้จากก้อนเห็ดแครงหลังการเก็บดอกเห็ด ของสาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ซึ่งทำการเพาะโดยใช้ก้อนเห็ดที่เตรียมทำจากการใช้สูตรขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม รำละเอียด 50 กิโลกรัม ภูไมซ์ 2 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.2 กิโลกรัม น้ำ 80 ลิตร ทั้งนี้การใช้ก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งหลังการเก็บดอกเห็ด จะเป็นการเพิ่มมูลค่าจากสิ่งเหลือทิ้งทางเกษตร

ทำการซื้อลูกปลานิลจากฟาร์มเพราะเลี้ยงของเกษตรกรภายในจังหวัด นครศรีธรรมราช โดยปลาที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจะมาจากแม่พันธุ์เพียงคู่เดียว เมื่อลูกปลาได้ขนาด 5 cm จะนำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดบรรจุน้ำ 1.5 m<sup>3</sup> ภายในโรงเรียนของสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ ภายใต้ระบบการเลี้ยงโดยใช้อาหาร 5% ต่อวัน โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง จนปลานิลมีขนาด 15 cm จึงนำไปทดลอง

##### 2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด crude glucan

จากการศึกษาที่ผ่านมา (Nitschke et al., 2011) พบว่าวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด crude glucan จากเส้นใยเห็ดประกอบด้วยวิธีการหลัก 2 รูปแบบ ได้แก่ Hot water extraction (HW) และ Alkaline extraction (ALK) เนื่องจากวิธีการทั้งสองรูปแบบมีกระบวนการสกัดที่ไม่ซับซ้อนและใช้ต้นทุนในการสกัดต่ำ รวมถึงใช้สารเคมีที่มีความเป็นพิษต่ำในกระบวนการสกัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ให้ความสำคัญต่อการพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมจากทั้งสองวิธีเป็นหลัก

2.2.1 กระบวนการสกัด crude glucan ด้วยวิธี HW ดัดแปลงจาก Angeli และคณะ (2009) โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด จำนวน 2 ปัจจัย ได้แก่ สัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำและรูปแบบการให้ความร้อน โดยกำหนดชุดการทดลองดังนี้

T1 สัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:10 ต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 °C เวลาในการสกัด 5 h

T2 สัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:10 autoclave 121 °C เวลาในการสกัด 30 min

T3 สัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:15 ต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 °C เวลาในการสกัด 5 h

T4 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:15 autoclave 121 °C เวลาในการสกัด 30 min

T5 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:20 ต้มในน้ำอุณหภูมิ 100 °C เวลาในการสกัด 5 h

T6 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อน้ำ 1:20 autoclave 121 °C เวลาในการสกัด 30 min

จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลาย และปรับ pH เป็น 7.0±0.1 ด้วย 0.1 M NaOH และเติม NaCl ให้สารละลายมีความเข้มข้น 1% NaCl จากนั้นตกตะกอน crude glucan ด้วย Absolute ethanol (40% V/V) บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 18 h จากนั้นเติม Hydrogenperoxide สกัดส่วน 1:1 (v/v) ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บตะกอน และล้างตะกอนจำนวน 2 รอบด้วย Absolute ethanol(4:1 v/v) และอบ crude glucan ให้แห้งที่ 70 °C เป็นเวลา 12 h

2.2.2 กระบวนการสกัด polysaccharide ด้วยวิธี ALK ดัดแปลงจาก Nitschke และคณะ (2011), Sietama และ Wessels (1977) โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดจำนวน 3 ปัจจัยและกำหนดปัจจัยอุณหภูมิคงที่ 60 °C ได้แก่ สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย ชนิดสารละลายและเวลาในการสกัด โดยกำหนดชุดการทดลองดังนี้

T1 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:10 NaOH เวลาในการสกัด 30 min

T2 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:10 NaOH เวลาในการสกัด 60 min

T3 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:10 KOH เวลาในการสกัด 30 min

T4 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:10 KOH เวลาในการสกัด 60 min

T5 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:20 NaOH เวลาในการสกัด 30 min

T6 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:20 NaOH เวลาในการสกัด 60 min

T7 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:20 KOH เวลาในการสกัด 30 min

T8 สกัดส่วนก้อนเห็ดเหลือทิ้งต่อตัวทำละลาย 1:10 KOH เวลาในการสกัด 60 min

กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษ whatman No.1 และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 10 ml และปรับ pH เป็น 7.0±0.1 ด้วย 6M HCl จากนั้นจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 h ซึ่งการศึกษาจะโดยมุ่งเน้นเปอร์เซ็นต์การสกัด glucan และคุณสมบัติการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นสำคัญ

2.3 การทดสอบปริมาณ glucan และองค์ประกอบของ polysaccharide ที่ได้จากการสกัด

การทดสอบปริมาณและองค์ประกอบของ glucan ดัดแปลงจาก Xu และคณะ (2012), Zhong และ Wang (2010) โดยทำการทดสอบ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณ glucan (Megazyme assay kit, K-YBGL, Ireland), การปนเปื้อน sulfuric acid, โปรตีน และ uronic acid

2.4 การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยนำผลที่ได้จากวิธีการที่สามารถสกัด glucan ได้ปริมาณสูงสุดและการปนเปื้อนต่ำสุด 2 กระบวนการแรกจากแต่ละวิธีสกัดมาใช้ทดสอบในหลอดทดลอง (In vitro) โดยดัดแปลงวิธีการจาก Yu และคณะ (2012), Ren และคณะ (2013) และ Shi และคณะ (2012) ซึ่งการศึกษาทั้งหมดจะทำการทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวรวมทั้งแยกจากไตส่วนหน้าของปลานิลและเพาะเลี้ยงในรูปแบบของ primary culture ตามวิธีการของ U-taynapun และคณะ (2011), Tolarová และคณะ (2014) ซึ่งมุ่งเน้นศึกษาการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง cellular response และ immune related gene โดยการศึกษา parameter ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนอง cellular response จำนวน 3 parameters ได้แก่ macrophage peroxidase (U-taynapun, 2011), macrophage respiratory burst activity (Li et

al., 2011), NO production (Cheng et al., 2008) และ immune related gene 3 ยีน ได้แก่ TLR4, MyD88 และ lysozyme g โดยชุดการทดลองประกอบด้วย

- T1 0.3 ml ของ PBS (Negative control)
- T2 0.3 ml 50 µg/ml B-glucan (Sigma) ใน PBS (positive control)
- T3 0.3 ml 50 µg/ml crude glucanHW1 ใน PBS
- T4 0.3 ml 50 µg/ml crude glucanHW2 ใน PBS
- T5 0.3 ml 50 µg/ml crude glucan ALK1 ใน PBS
- T6 0.3 ml 50 µg/ml crude glucan ALK2 ใน PBS

#### 2.5 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

สกัด total RNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ชุดสกัด RNeasy Mini Kit (Qiagen) วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ total RNA ที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำ RNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ซึ่งประกอบด้วย RNA 1 µg, oligodT, 5X first-strand buffer, dNTP mixture, DTT, เอนไซม์ SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย 72 °C อีก 10 นาที แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C

#### 2.6 การโคลนนิ่งชิ้นส่วนของยีนที่สนใจ

ทำ PCR โดยใช้ degenerate primers ที่ออกแบบจาก conserved regions ของยีนที่สนใจ ซึ่งทราบลำดับเบสที่แน่นอนแล้วของปลาและสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงอื่นๆ ซึ่งรายงานไว้ในฐานข้อมูลสากล (GenBank) โดย PCR reaction ประกอบด้วย 200 µM ของ dNTP, 1.5-2.5 µM ของ MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer, 0.2 µM ของ primer แต่ละเส้น, 1 µl ของ cDNA และ 1.5 U ของ Taq polymerase (Invitrogen) แล้วทำปฏิกิริยา PCR ที่ annealing temperature ระหว่าง 55-65 °C จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปทำ electrophoresis แล้วสกัด oligonucleotide ที่ได้โดยการใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA extraction kit (RBC bioscience) หลังจากวัดปริมาณและความบริสุทธิ์นำไปหาลำดับเบสของยีนที่สนใจเมื่อได้ลำดับเบสแล้วทำการเช็คกับฐานข้อมูลสากล เพื่อยืนยันเบื้องต้นว่าลำดับเบสดังกล่าวเป็นของยีนที่สนใจ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้จาก degenerate primers และมีความยาวเท่ากับ PCR products ที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นชิ้นส่วนยีนที่สนใจ โคลนเข้าสู่ Vector pGEM T Easy (Promega, US) ตามวิธีการของบริษัทและตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่ทำการโคลน

#### 2.7 การพัฒนา Specific primers ที่จำเพาะต่อยีนที่สนใจ

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ ที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น นำมาเป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับยีนเดียวกันในปลาชนิดอื่นๆ ข้อมูลยีนชนิดอื่นๆของปลานิลและนิวคลีโอไทด์จากแหล่งอื่นๆที่อาจจะปนเปื้อนในระบบการตรวจสอบ แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่า มีรายงานยีนของปลานิลในฐานข้อมูลนานาชาติไม่มากนัก จึงทำให้ primer ที่ทำการออกแบบอาจจะไม่จำเพาะต่อยีนที่สนใจของปลานิล ดังนั้นนักวิจัยจึงต้องทำการออกแบบ primer อย่างน้อย 2 ชุดและทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตที่ได้จาก primer แต่ละชุดโดยการ Cloning (pGEM-TEasy (Promega)) เพื่อยืนยันความถูกต้องของ ชุด primer ที่ทำการตรวจวัด การออกแบบ primer ตรวจจับ โดยออกแบบดีเอ็นเอตรวจจับด้วยโปรแกรม primer 3 จากนั้นทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในการตรวจสอบยีนที่สนใจในเนื้อเยื่อของปลา รวมถึงทดสอบความจำเพาะของ primer โดยการทดสอบความจำเพาะปลานิลจากแหล่งต่างๆ ไม่น้อยกว่า 3 แหล่ง เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

#### 2.8 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจในเม็ดเลือดขาวปลานิลด้วยเทคนิค qPCR



ทำการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อที่ต้องการทดสอบ (ไตตอนหน้าและเม็ดเลือดขาวรวม) โดยนำเม็ดเลือดปลานิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร crude glucan ที่ระดับต่างๆ เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจ โดยนำเม็ดเลือดข้างต้นมาสกัด total RNA เพื่อนำไปสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) หลังจากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย primer ซึ่งออกแบบจากข้อมูลยีนข้างต้นและมียีน B-actin ของปลานิลเป็น internal marker (U-taynapun, 2011)

### 3. การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพ crude glucan nanoparticle จากก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้งต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิล

#### 3.1 ปลานิลที่ใช้ในการทดลอง

ปลานิลจากฟาร์มเลี้ยงของเกษตรกรภายในจังหวัด นครศรีธรรมราช โดยปลาที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจะมาจากฟาร์มเลี้ยงของพ่อแม่พันธุ์เพียงคู่เดียว เมื่อลูกปลาได้ขนาด 5 cm จะนำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาดบรรจุน้ำ 1.5 m<sup>3</sup> ภายในโรงเรียนของสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ ภายใต้ระบบการเลี้ยงโดยใช้อาหาร 5% ต่อวัน โดยแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง จนปลานิลมีขนาด 15 cm จึงทำการสุ่มปลานิลจำนวน 15 ตัวต่อถัง (200 l) จำนวน 15 ถัง และเลี้ยงปรับพฤติกรรมปลานิลให้คุ้นชินกับถังเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

#### 3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต crude glucan nanoparticle

การพัฒนา glucan nanoparticle (GN) สามารถทำได้หลายรูปแบบ โดยรูปแบบที่เหมาะสมและมีการคงตัวสูง ได้แก่ Combined Chatisan-alginate nanoparticle ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ให้ความสำคัญต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต crude glucan nanoparticle จากทั้งสองวิธีเป็นหลัก

3.2.1 กระบวนการผลิต crude glucan bio-nanoparticle ชนิด Combined Chatisan-alginate nanoparticle ด้วยวิธี อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ/การก่อเกิดเจล (modified emulsification/gelation, O/W) ดัดแปลงจาก Lertsutthiwong และคณะ (2008, 2009) โดยทำการศึกษาสัดส่วนของ chitosan/alginate ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต crude glucan bio-nanoparticle โดยกำหนดชุดการทดลองดังนี้

T1 สัดส่วน glucan/chitosan/alginate 0.1:0:1w/w

T2 สัดส่วน glucan/chitosan/alginate 0.1:0.025:1 w/w

T3 สัดส่วน glucan/chitosan/alginate 0.1:0.05:1 w/w

T4 สัดส่วน glucan/chitosan/alginate 0.1:0.1:1 w/w

โดยมีวิธีการพื้นฐานโดยสังเขปดังนี้ อิมัลชัน O/W เตรียมจากการหยดสารละลายปริมาตร 0.6 ml ของ น้ำมันมะกอกในเอทิลแอลกอฮอล์ (2% v/v) และ glucan ลงในวัฏภาคน้ำของสารละลาย alginate (0.6 mg/ml) และ chitosan ที่มี 1% Tween 80<sup>®</sup> ทำให้กระจายตัวด้วย sonicator 15 นาที จากนั้นผสมรวมกับ 4 ml สารละลาย CaCl (0.67 mg/ml) โดยมีการกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นผสมรวมกับ 4 ml สารละลาย chitosan ใน 1% (v/v) acetic acid และผสมรวมกับ 4 ml สารละลาย โดยความเข้มข้นของ chitosan จะขึ้นอยู่กับชุดทดลองแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และแยกเอทิลแอลกอฮอล์ โดย rotary evaporation ที่ 40°C 20 นาที เก็บ crude glucan bio-nanoparticle ในรูปสารละลายในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าใช้งาน (Lertsutthiwong *et al.*, 2009)

3.2.2 กระบวนการผลิต crude glucan bio-nanoparticle ชนิด Pure glucan nanoparticle ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Anusuya และ Sathiyabama (2014) และ Huong และคณะ (2011) โดยทำการศึกษา

สัดส่วนของ NaOH ต่อการเกิดโครงสร้าง nanoparticle ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต crude glucan bio-nanoparticle โดยกำหนดชุดการทดลองดังนี้

T1 0.1% (w/v) glucan in 100 ml ของ 2% NaOH

T2 0.1% (w/v) glucan in 100 ml ของ 1% NaOH

T3 0.1% (w/v) glucan in 10 ml ของ 2% NaOH

T4 0.1% (w/v) glucan in 10 ml ของ 1% NaOH

โดยมีวิธีการพื้นฐานโดยสังเขปดังนี้ละลาย glucan ในสารก่อโครงสร้าง (ตามความเข้มข้นละ ปริมาณที่กำหนด) โดยมีการกวนอย่างต่อเนื่อง ภายใต้อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บ glucan bio-nanoparticle โดยการปั่นตกตะกอน 13000 rpm. อุณหภูมิ 4°C 30 นาทีเก็บ crude glucan bio-nanoparticle ในรูปสารละลายใน 1% (v/v) acetic acid ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าใช้งาน

### 3.2.3 การทดสอบคุณสมบัติ crude glucan bio-nanoparticle

การวัดขนาดอนุภาค

การวัดขนาดของอนุภาค crude glucan bio-nanoparticle โดย Scanning electron microscopy (Huong *et al.*, 2011)

### 3.3 การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ crude glucan bio-nanoparticle

เลือก crude glucan bio-nanoparticle ที่มีขนาด ไม่เกิน 1000 um และมีความต่างศักย์ zeta มากกว่า 30 mV หรือต่ำกว่า -30 mV จำนวน 1 รูปแบบจากการเตรียมแต่ละวิธีการออกแบบการทดลองการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แบบ CRD โดยกำหนดชุดการทดลองดังนี้

T1 0.1 ml ของ PBS (Negative control)

T2 0.1 ml 50 µg/ml B-glucan (Sigma) ใน PBS (positive control)

T3 0.1 ml 50 µg/ml crude glucan bio-nanoparticle 1 ใน PBS

T4 0.1 ml 50 µg/ml crude glucan bio-nanoparticle 2 ใน PBS

การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันซึ่งการศึกษาทั้งหมดจะมุ่งเน้นศึกษาการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง cellular response และ immune related gene โดยการศึกษา parameter ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนอง cellular response จำนวน 3 parameters ได้แก่ macrophage peroxidase (U-taynapun, 2101), macrophage respiratory burst activity (Li, In press), NO production (Cheng *et al.*, 2008) และ immune related gene 3 ยีน ได้แก่ TLR4, MyD88 และ lysozyme g เช่นเดียวกับการศึกษาในข้อ 2.5

การทดลองทั้งหมดจะทำ 3 ซ้ำและข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ one-way ANOVA ในโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยกำหนดค่าความแตกต่างทางสถิติ  $P < 0.05$  ความแตกต่างระหว่างค่า mean จะถูกวิเคราะห์โดยใช้ Tukey Kramer test

## 4. สถานที่เก็บตัวอย่างและทำการวิจัย

หน่วยวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

## 2.4 โครงการวิจัยย่อยที่ 4 การใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช

### วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

#### 1. วัสดุอุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ผักกวางตุ้ง และ มะเขือเปราะ
2. ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่า
3. เครื่องมือเก็บตัวอย่างดิน (กระบอกเก็บดิน และ จอบ)
4. เครื่องมือเตรียมตัวอย่างดิน (โกร่งบดดิน และ ตะแกรงร่อนดินเบอร์ 10)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
6. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Digital Caliper)
7. ตลับเมตร
8. ไม้เมตร
9. ปุ๋ยเคมี และ ปุ๋ยคอก
10. ถังพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง
11. สายยาง
12. รถเข็น
13. ถังพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 200 ลิตร
14. ถังพลาสติกที่มีฝาปิดแบบลิ้นชักขนาด 200 ลิตร
15. กากน้ำตาล
16. เชื้อซูปเปอร์ พด.2
17. บัวรดน้ำ
18. กรรไกรตัดแต่ง
19. ตาชั่งพรางแสง
20. พีวเจอร์บอร์ด
21. ปากกาเคมี
22. ลวด
23. เชือกฟาง

#### 2. วิธีการดำเนินการ แผนการทดลอง และ การเก็บข้อมูล

2.1 วิเคราะห์สมบัติต่างๆ และ ธาตุอาหารพืชที่มีในก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่า และ วิเคราะห์ดิน

2.1.1 ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่า วิเคราะห์หาปริมาณความชื้นของก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าโดยวิธีการอบแห้ง ปริมาณลิกนิน และเซลลูโลส ตามแบบของ NREL (Moore and Johnson, 1967; Seaman *et al.*, 1954 และ Sluiter, 2010) ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ปริมาณเส้นใย และปริมาณเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1989) นำไปวัดปฏิกิริยา (pH) ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (วัสดุ : น้ำ = 1 : 5) และ อินทรีย์วัตถุโดยวิธีวอล์คเลย์-แบลค (Walkley and Black method) วิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus) วัดโดยสกัดด้วยน้ำยาสกัดเบรย์ทู (Bray II) นำไปปรับสีด้วยวิธีโมลิบดีนัมบลู (molybdenum blue method) แล้ววัดค่าด้วยเครื่องวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โฟแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable potassium) วัดโดยสกัดด้วยสารละลายแอมโมเนียม อะซีเตต



(ammonium acetate) พีเอช 7 นำไปวัดด้วยเครื่องเฟลมโฟโตมิเตอร์ แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable calcium and magnesium) วัดด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (จำเป็น, 2547)

2.1.2 ตัวอย่างดิน ก่อนการทดลองเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-20 เซนติเมตร แล้วนำดินที่มากลุกรวมกันเพื่อเป็นตัวแทนของดิน (composite sample) ตัวอย่างดินที่เก็บได้นำมาผึ่งในที่ร่มจนแห้งสนิท บดด้วยโกร่ง ร่อนผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร และนำไปวัดปฏิกิริยาดิน (pH) ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (ดิน : น้ำ = 1 : 5) อินทรีย์วัตถุโดยวิธีวอล์คเลย์-แบลค (Walkley and Black method) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphorus) วัดโดยสกัดดินด้วยน้ำยาสกัดเบรย์ยู (Bray II) นำไปปรับสีด้วยวิธีโมลิบดีนัมบลู (molybdenum blue method) แล้ววัดค่าด้วยเครื่องวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable potassium) วัดโดยสกัดดินด้วยสารละลายแอมโมเนียม อะซีเตต (ammonium acetate) พีเอช 7 นำไปวัดด้วยเครื่องเฟลมโฟโตมิเตอร์ แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable calcium and magnesium) วัดด้วยเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (จำเป็น, 2547)

2.2 การใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ โดยนำวัสดุที่ได้จากก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่ามาหมักในถังพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 200 ลิตร เติมตัวเร่งในการย่อยสลายวัสดุซึ่งคือจุลินทรีย์ที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกัน การวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Block Design : CRD) มี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 5 สิ่งทดลอง ดังนี้

- (1) สิ่งทดลองที่ 1 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลไก่
- (2) สิ่งทดลองที่ 2 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลวัว
- (3) สิ่งทดลองที่ 3 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลสุกร
- (4) สิ่งทดลองที่ 4 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากเชื้อ พด.2
- (5) สิ่งทดลองที่ 5 : ชุดควบคุม (ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ใด ๆ)

การเก็บข้อมูล บันทึกข้อมูลโดยวัดปริมาตรรวมของก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่าหลังการหมักไปปรับปรุงดินตามวิธีการในหัวข้อที่ 2.4

2.3 การใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตสารสกัดชีวภาพ โดยนำวัสดุที่ได้จากก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่ามาหมักในถังพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 100 ลิตร ส่วนผสมในการหมัก คือ วัสดุที่ได้จากก้อนเชื้อเพาะเห็ดเก่า: กากน้ำตาล: น้ำ ในอัตราส่วน 4: 1: 1 สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้นำมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Block Design: CRD) มี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 5 สิ่งทดลอง ดังนี้

- (1) สิ่งทดลองที่ 1 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลไก่
- (2) สิ่งทดลองที่ 2 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลวัว
- (3) สิ่งทดลองที่ 3 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากมูลสุกร
- (4) สิ่งทดลองที่ 4 : ใช้แหล่งจุลินทรีย์จากเชื้อ พด.2
- (5) สิ่งทดลองที่ 5 : ชุดควบคุม (ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ใด ๆ)

การเก็บข้อมูล บันทึกข้อมูลตลอดช่วงเวลาของการหมัก เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำสารสกัดชีวภาพ มาวัดปริมาตร และวิเคราะห์สมบัติบางประการ เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าหลังการหมักไปปรับปรุงดินตามวิธีการในหัวข้อที่ 2.4

2.4 การใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าเพื่อปรับปรุงดินสำหรับการปลูกพืช โดยนำดินผสมกับก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า และ ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว ปลูกพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ



ผักกวางตุ้ง และ มะเขือเปราะ วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Block Design : CRD) มี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 6 สิ่งทดลอง ดังนี้

- (1) สิ่งทดลองที่ 1 : ดิน 75 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า 25 %
- (2) สิ่งทดลองที่ 2 : ดิน 50 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า 50 %
- (3) สิ่งทดลองที่ 3 : ดิน 25 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า 75 %
- (4) สิ่งทดลองที่ 4 : ดิน 75 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว 25 %
- (5) สิ่งทดลองที่ 5 : ดิน 50 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว 50 %
- (6) สิ่งทดลองที่ 6 : ดิน 25 % : ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว 75 %

การเก็บข้อมูล บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนใบ น้ำหนักต้น ผลผลิต ข้อมูลดินเก็บตัวอย่างดินก่อนและหลังการทดลองเพื่อวิเคราะห์สมบัติบางประการ ได้แก่ ปรากฏิยาติน หรือความเป็นกรดต่าง (พีเอช : pH) อินทรีย์วัตถุในดิน และ ธาตุอาหารพืชในดิน

#### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

#### 5. สถานที่ทำการทดลอง

สาขาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช 1 09 หมู่ 2 ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช



## บทที่ 3

### สรุปผลการดำเนินการโครงการวิจัย

ผลการดำเนินงานโครงการวิจัยย่อยทั้ง 4 โครงการ ภายใต้แผนงานวิจัยได้นำมาสรุปไว้โดยสังเขปในบทนี้ ซึ่งรายละเอียดต่างๆ ได้รวบรวมและเขียนไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ของแต่ละโครงการวิจัยย่อย ผลการดำเนินงานและข้อสรุปโดยสังเขปของแต่ละโครงการมีดังนี้

#### 3.1 ผลดำเนินงานโครงการวิจัยย่อยที่ 1

**เรื่อง** การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด  
**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1. เพื่อพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด
2. เพื่อทราบต้นทุนการผลิตในการเพาะเห็ดแครงเชิงการค้าเปรียบเทียบกับระหว่างกากมะพร้าวและรำข้าวละเอียด
3. ศึกษาอัตราส่วน ขี้เลื่อยใหม่: วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า: รำละเอียด: กากมะพร้าวสด: กากมะพร้าวแห้ง: ปูนขาว: ดิเกลื้อ ที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดแครง

#### สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวสดเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยมีอัตราส่วนของกากมะพร้าวสดและแห้งกับรำข้าวละเอียด มี 5 ระดับ ผลการศึกษาพบว่าในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า การเจริญของเส้นใยเห็ด เมื่อเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสูตรที่ 1 ถึง 5 ในงานเพาะเชื้อ พบว่ามีการเจริญของโคโคนีแตกต่างกันและมีอัตราการเจริญของเส้นใยในวันที่ 3 5 และ 7 พบว่า ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสีขาวฟู และสามารถเจริญได้เต็มผิววัสดุเมื่อเทียบกับสูตรที่ 1 และความหนาแน่นของเส้นใยพบว่าในสูตรที่ 1, 4, 5, 8 และ 9 มีเส้นใยเจริญหนาแน่นมาก

การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) หลังใส่หัวเชื้อ พบว่า สูตรรำข้าวละเอียด 100 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญของเส้นใยในก้อนเชื้อเห็ดแครง เท่ากับ 10.41 เซนติเมตร ผลผลิตรวมทั้งหมด โดยชั่งน้ำหนักจำนวนดอกเห็ดของแต่ละบาดแผล พบว่า สูตรกากมะพร้าวอบแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลรวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 49.96 กรัมต่อก่อน จำนวนดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรรำข้าวละเอียด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนดอกเห็ดแครงมากที่สุด คือ 116.77 ดอกต่อก่อน ความกว้างดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 50:50 มีความกว้างดอกมากที่สุด คือ 2.02 เซนติเมตรต่อดอก และความยาวดอก พบว่าสูตรสูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีความยาวดอกมากที่สุด คือ 2.52 เซนติเมตรต่อดอก

ต้นทุนการผลิตเห็ดแครง พบว่า อัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว สำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดแครง ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ 1) กากมะพร้าวแห้งที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด และ 2) กากมะพร้าวสด และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด พบว่า สูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีต้นทุนในการผลิตเห็ดแครง คือ 1.88 บาทต่อก่อน และมีรายรับสูงสุดคือ 9.99 บาท/ก้อน

จากการศึกษาการพัฒนาวัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยและการใช้กากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียดสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดแครง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง มีอัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยใหม่กับก้อนเชื้อเห็ดเก่า จำนวน 5 สิ่งทดลอง อัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยใหม่กับก้อนเชื้อเห็ดเก่าและการใช้กากมะพร้าวสดทดแทนรำข้าวละเอียด จำนวน 11 สิ่งทดลอง และอัตราส่วนระหว่างขี้เลื่อยใหม่กับก้อนเชื้อเห็ดเก่าและการใช้กากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด จำนวน 11 สิ่งทดลอง ในการเพาะเห็ดแครงระดับเรือนทดลอง พบว่า สูตรที่ 1 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 100:0 มีการเจริญของเชื้อดีที่สุด คือ 10.41 เซนติเมตร สูตรที่ 9 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 25:75 และกากมะพร้าวสดกับรำข้าวละเอียด 75:25 ให้น้ำหนักผลผลิตมากที่สุด คือ 105.37 กรัมต่อ และสูตรที่ 1 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 100:0 และกากมะพร้าวสดกับรำข้าวละเอียด 0:100 มีจำนวนดอกเห็ดมากที่สุด คือ 116.5 ดอกต่อช่อ สูตรที่ 2 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 0:100 และสูตรที่ 8 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 50:50 และกากมะพร้าวอบแห้งกับรำข้าวละเอียด 25:75 ให้ความกว้างดอกมากที่สุด คือ 3.37 เซนติเมตรต่อดอก สูตรที่ 7 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 50:50 และกากมะพร้าวอบแห้งกับรำข้าวละเอียด 50:50 ให้ความยาวดอกมากที่สุด คือ 3.20 เซนติเมตรต่อดอก สูตรที่ 2 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 0:100 ให้ความหนาของดอกมากที่สุด คือ 0.45 เซนติเมตรต่อดอก ต้นทุนและรายรับสุทธิในการผลิตเห็ดแครง 1 กิโลกรัม พบว่า สูตรที่ 8 อัตราการใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 50:50 และกากมะพร้าวสดกับรำข้าวละเอียด 25:75 มีต้นทุนน้อยที่สุดและมีรายรับสุทธิมากที่สุดคือ 16.83 และ 183.17 บาทต่อกิโลกรัม

การพัฒนาวัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยใหม่ เมื่อนำวัสดุไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางอาหารที่มีในวัสดุเพาะขี้เลื่อยไม่อย่างพาราใหม่กับวัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดเก่า พบว่า วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดเก่ามีโปรตีน ( $5.27 \pm 0.04$  เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าขี้เลื่อยไม่อย่างพาราใหม่ ( $1.37 \pm 0.05$  เปอร์เซ็นต์) แต่วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดเก่ามีไขมัน ( $0.655 \pm 0.001$  เปอร์เซ็นต์) ต่ำกว่าขี้เลื่อยไม่อย่างพาราใหม่ ( $7.359 \pm 0.074$  เปอร์เซ็นต์) ส่วนของพลังงาน (calories/g) พบว่า วัสดุจากก้อนเชื้อเห็ดเก่า ( $2,979 \pm 63.0$  calories/g) สูงกว่าวัสดุเพาะขี้เลื่อยไม่อย่างพาราใหม่ ( $2,660 \pm 180.2$  calories/g)

ดังนั้นสรุปได้ว่า การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุ่โดยการนำกากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด พบว่า สูตรกากมะพร้าวอบแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลรวมทั้งหมดมากที่สุด และการพัฒนาวัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าทดแทนขี้เลื่อยและการใช้กากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียด พบว่า การใช้ขี้เลื่อยไม่อย่างพารากับก้อนเชื้อเห็ดเก่า 25:75 และกากมะพร้าวสดกับรำข้าวละเอียด 75:25 ให้น้ำหนักผลผลิตมากที่สุด สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตในส่วนขี้เลื่อยและรำข้าวละเอียดที่มีราคาสูงและหาได้ยาก และสามารถช่วยป้องกันการสะสมของโรค แมลง และความเสียหายต่อสภาพแวดล้อมที่จะเกิดได้จากการทิ้งก้อนเชื้อเห็ดที่ใช้แล้ว จากการทดลองแสดงว่าก้อนเชื้อเห็ดเก่าและกากมะพร้าวสามารถนำมาทดแทนได้



### 3.2 ผลดำเนินงานโครงการวิจัยย่อยที่ 2

เรื่อง การใช้ประโยชน์จากสารทุติยภูมิจากเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้ง
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้ง
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้งต่อการต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชันในปลาเศรษฐกิจ

ปลาเศรษฐกิจ

#### สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและสัตว์น้ำ 2 ชนิดคือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* พบว่าสารสกัดหยาบ รวมถึงสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ หรือสารสกัดบริสุทธิ์จากการทำลายด้วยตัวทำลายทั้ง 7 ชนิด ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ แสดงให้เห็นว่าเห็ดแครงไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด (ผลการศึกษาปีที่ 1) จึงทำการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำลายชนิดต่างๆ ต่อการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ก็พบว่าไม่สามารถต้านทานเซลล์มะเร็งได้ จึงทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ด้วยวิธีต่าง ๆ กันประกอบด้วย DPPH, ATBS และ Metal chelating activity พบว่าสารสกัดจากเห็ดแครงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยตัวทำลายที่ต่างกันให้การออกฤทธิ์ต้านที่แตกต่างกัน โดยในการทดสอบทั้ง 3 วิธีให้ผลการต้านที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระสูงที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับคือเห็ดแครงที่สกัดด้วย 2-บิวทานอล รองลงมาคือเห็ดแครงที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เฮกเซน และน้ำ ในขณะที่เห็ดแครงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทิลแอลกอฮอล์มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุด จึงคัดเลือกสารสกัดจากเห็ดแครงที่สกัดด้วยตัวทำลาย 4 ชนิดประกอบด้วย เมทานอล บิวทานอล ไดคลอโรมีเทน และน้ำ ผสมในอาหารเลี้ยงปลาตู้ที่ระดับ 0.5% เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม อาหารทางการค้า และอาหารที่ผสมเศษเหลือเห็ดแครงปนที่ระดับ 1% ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และการเป็นสารต้านทานความเครียดแบบออกซิเดชัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเห็ดแครงต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลาตู้ แต่สารสกัดเห็ดแครงด้วยตัวทำลายชนิดต่าง ๆ กันมีผลต่อค่าภาวะเครียดแบบออกซิเดชันในตัวปลา โดย การใช้สารสกัดจากเห็ดแครงด้วยตัวทำลายต่างกันมีผลลดระดับการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในตับลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยปลาที่ได้รับสารสกัดเห็ดแครงด้วยเมทานอล มีผลลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่ำสุด นอกจากนี้ยังมีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานอนุมูลอิสระของร่างกาย โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดเห็ดแครงด้วยไดคลอโรมีเทน และน้ำมีค่ากิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสสูงสุด ซึ่งจะส่งผลให้ปลามีความสามารถในการต้านทานสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ และทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอมหรือต่อความเครียดที่อาจจะเกิดขึ้นได้เช่นที่ สูงขึ้น แต่ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้สารสกัดจากเห็ดแครงเหลือทิ้งด้วยตัวทำลายชนิด เมทานอล บิวทานอล และไดคลอโรมีเทนที่ระดับ 0.5% สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาตู้ได้อันจะส่งผลให้เพิ่มความสามารถในการป้องกันการความเครียดแบบออกซิเดชันในตัวปลาได้ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรได้



### 3.3 ผลดำเนินงานโครงการวิจัยย่อยที่ 3

เรื่อง การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) ชนิด crude glucan bio-nanoparticle จากก้อนเห็ดแครง (*Shizophyllum commune*) เหลือทิ้งหลังเก็บเกี่ยว

#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน crude glucan bio-nanoparticle จากเส้นใยเชื้อเห็ดแครงในก้อนเห็ดแครงเหลือทิ้ง

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ crude glucan bio-nanoparticle ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาไนล

#### สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

จากการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ crude glucan โดยเปรียบเทียบระหว่าง Hot water extraction และ Alkaline extraction ผลพบว่าวิธี Hot water โดยการทำให้ autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เห็ดเหลือทิ้ง:น้ำ ในสัดส่วน 1:15 (HW-121-30-1:15) ทำให้ได้ปริมาณสารสกัดที่มี carbohydrate หรือ polysaccharide ในสัดส่วนมาก ซึ่งในส่วน carbohydrate ที่สกัดมาได้คิดเป็น glucan ในรูป  $\beta$ -glucan สูงถึง 97% และ  $\alpha$ -glucan 3% ในสารสกัดที่ได้ยังมีโปรตีน ไขมัน และ phenolic compound (ตารางที่ 1)

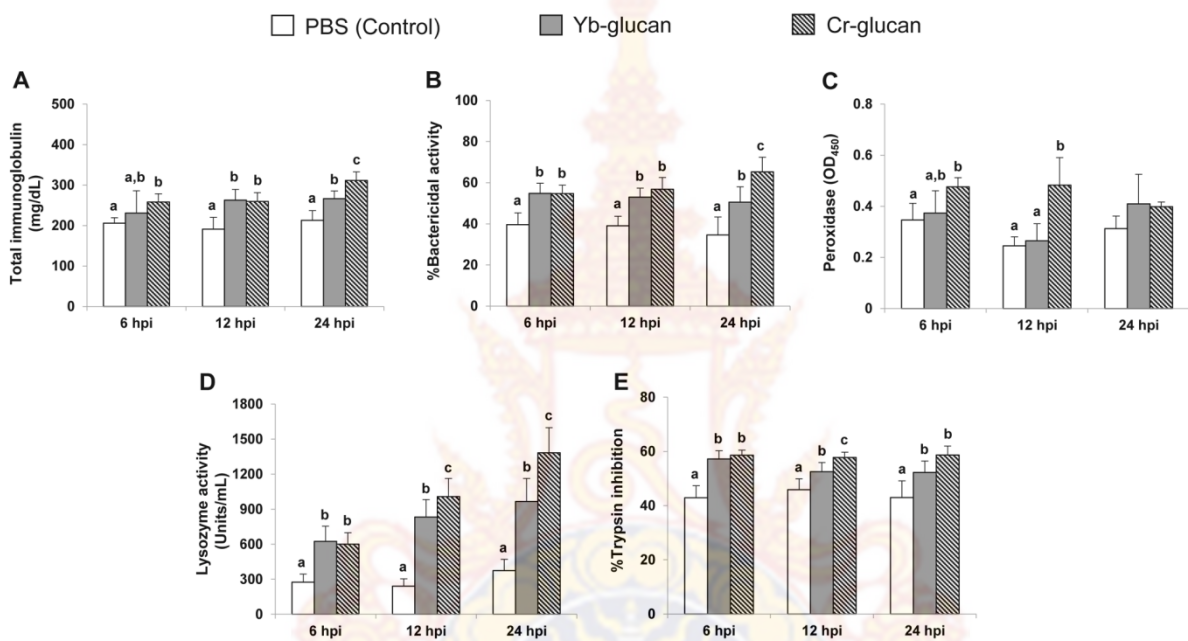
ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสาร crude glucan (HW-121-30-1:15)

Components	Crude glucan
Yield (g/100g dry weight)	3.17±0.32
Total carbohydrate (g/100 g crude glucan)	28.84±2.18
Total protein (g/100 g crude glucan)	8.68±0.85
Total phenolic compound (g/100 g crude glucan)	1.29±0.13
Total glucan (g/100 g crude glucan)	27.15±1.38
$\beta$ -glucan (g/100 g crude glucan)	26.67±1.45
$\alpha$ -glucan (g/100 g crude glucan)	0.48±0.06

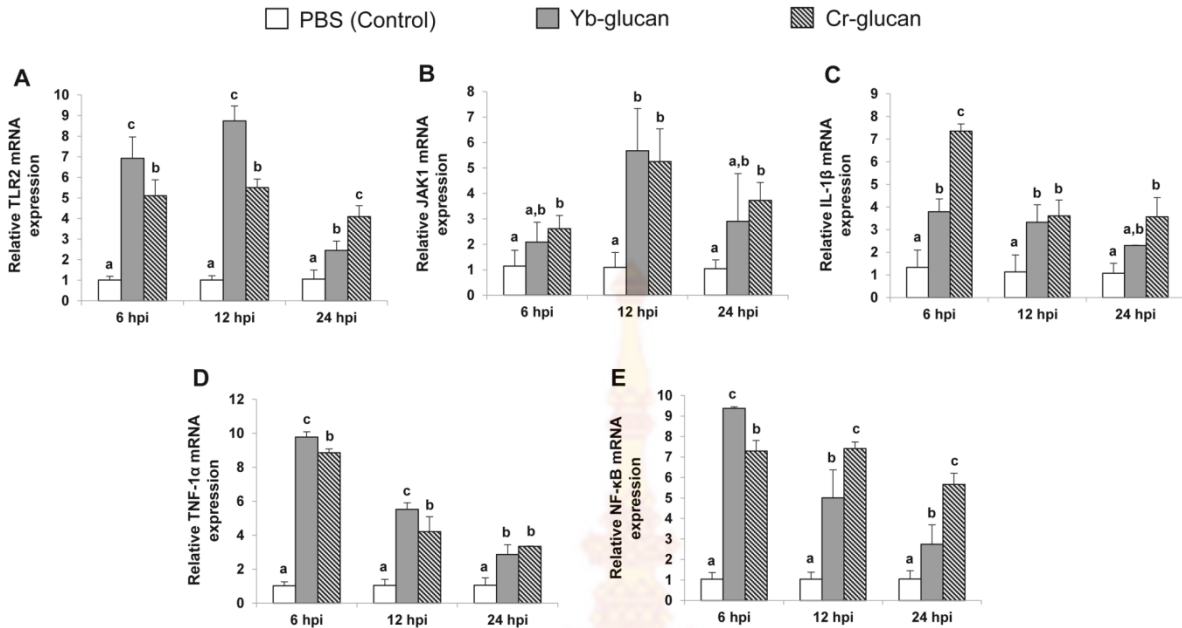
หลังจากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ crude glucan โดยเปรียบเทียบกับ glucan จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ความบริสุทธิ์  $\geq 98\%$ , Sigma) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพที่ดีในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ และมีการใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยการฉีดสารสกัด crude glucan และ yeast glucan เข้าปลาไนล (ขนาด  $70\pm 0.5$  g) กำหนดให้สารที่ฉีดเข้าปลาไนลมี glucan เท่ากันที่  $10\ \mu\text{g}$  โดยใช้ปลาที่ฉีดด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) เป็นชุดควบคุม (control) แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังฉีดสารกระตุ้น เพื่อศึกษาระบบ non-specific immune หรือ innate immune response ในปลาไนล โดยเก็บตัวอย่างเลือด (สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเม็ดเลือด, differential leukocyte, humoral immune parameters ได้แก่ total immunoglobulin, bactericidal activity, peroxidase, lysozyme และ anti-protease) เนื้อเยื่อไตส่วนหน้า (สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ Toll-like receptor 2 (TLR2), Janus kinase 1 (JAK1), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), tumor necrotic factor- $1\alpha$

(TNF-1 $\alpha$ ) และ nuclear factor-kB (NF-kB) ด้วยวิธี quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) โดยใช้  $\beta$ -actin เป็นยีนเปรียบเทียบกับ

ผลการกระตุ้น innate immune response ในปลานิล พบว่า crude glucan มีความสามารถในการกระตุ้น innate immune response เช่นเดียวกับ yeast glucan โดยพบว่าค่า humoral parameter ต่าง ๆ และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วย crude glucan และ yeast glucan ( $P < 0.05$ ) แต่แตกต่างอย่างชัดเจนกับปลาในชุดควบคุม ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2



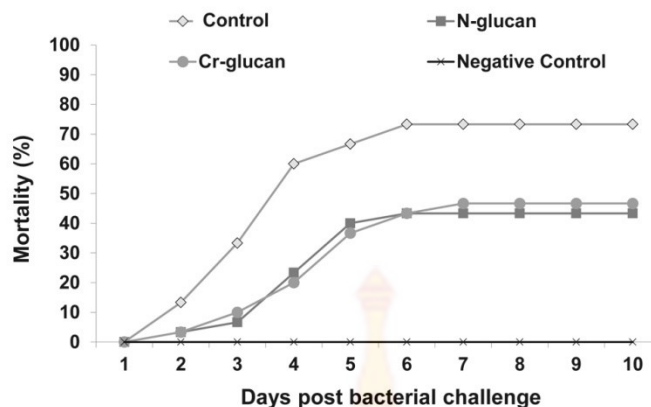
ภาพที่ 1 Humoral innate immune parameters (A) Total immunoglobulin (B) Bactericidal activity, (C) Peroxidase, (D) Lysozyme activity และ (E) %Anti-protease activity แสดงผลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=6). ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดข้อมูล ( $P < 0.05$ )



ภาพที่ 2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน (A) TLR2, (B) JAK1, (C) IL-1 $\beta$ , (D) TNF-1 $\alpha$  และ (E) NF- $\kappa$ B แสดงผลด้วยค่า mean $\pm$ SD (n=6). ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดข้อมูล (P<0.05)

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบประสิทธิภาพของ crude glucan ในการเพิ่มความต้านทานของปลานิลต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *A. veronii* พบว่าปลานิลที่ฉีดด้วย crude glucan มีอัตราการรอดตายสูงสุด ตามด้วย yeast glucan และ PBS ตามลำดับ

เมื่อได้ข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ crude glucan ที่ได้จากก้อนเห็ดเหลือทิ้งแล้ว จึงได้ทำการพัฒนารูปแบบโดยทำ bio-nanoparticle ด้วยวิธี alginate แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของ crude glucan bio-nanoparticle (N-glucan) ที่ได้ ด้วยการติดตาม immune parameter ดังข้างต้น รวมถึงอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับ N-glucan เปรียบเทียบกับ crude glucan (Cr-glucan) ปกติ และไม่ได้รับ glucan ใด ๆ เลย ผลพบว่า N-glucan สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ไม่แตกต่างจาก Cr-glucan โดยผลแสดงอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับกระตุ้นทั้ง 2 รูปแบบหลังจากฉีดเชื้อ *A. veronii* ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 อัตราการตายของปลาไนที่กระตุ้นด้วย crude glucan bio-nanoparticle (N-glucan) เปรียบเทียบกับ crude glucan (Cr-glucan) และ control (ไม่มี glucan) แล้วฉีดซ้ำด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. veronii* โดยมีปลาที่ไม่ได้รับเชื้อแบคทีเรียเป็น negative control

#### ผลที่ได้รับ

1. องค์ความรู้ใหม่ในการสร้างสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากวัสดุเหลือใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครง ชนิด crude glucan และ bio-nanoparticle
  2. ลดของเสียและเพิ่มมูลค่าของก้อนเห็ดเหลือทิ้งจากการเลี้ยงเห็ดแครงของเกษตรกร
  3. เพิ่มขีดความสามารถในการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิด glucan ในปลาเศรษฐกิจของประเทศไทย
  4. ผลงานวิจัยที่ส่งเข้าสู่กระบวนการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสาร Fish and Shellfish Immunology (Q1 ในระบบฐานข้อมูล Scimago<sup>®</sup>) จำนวน 1 เรื่อง คือ “Crude Glucan from By-Product Mushroom Cultivation Pulp of *Schizophyllum commune* Enhances Innate Immunity and Resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas veronii*”
  5. องค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ในด้านการพัฒนาศักยภาพและเพิ่มมูลค่าของสิ่งเหลือใช้ทางการเกษตร การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของทรัพยากรธรรมชาติและถึงความมั่นคงทางอาหารของประเทศไทย
- กลุ่มเป้าหมาย
1. นักวิชาการในสาขาจุลชีววิทยา เทคโนโลยีชีวภาพและเคมีอินทรีย์
  2. บุคคลากรในอุตสาหกรรมการผลิตยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



### 3.4 ผลดำเนินงานโครงการวิจัยย่อยที่ 4

เรื่อง การใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเหาะเห็ดเก่ามาผลิตก๊าซชีวภาพ
2. เพื่อศึกษาผลของการนำของก้อนเชื้อเหาะเห็ดเก่ามาผลิตสารสกัดชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาผลของการใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดเก่าเป็นวัสดุปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช

#### สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย

การศึกษาการใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าเพื่อผลิตก๊าซชีวภาพ สารสกัดชีวภาพ และ ปรับปรุงดิน เพื่อการปลูกพืช สามารถสรุปข้อมูลเบื้องต้นได้ ดังนี้

1. ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่ามีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นอินทรีย์วัตถุซึ่งพบว่ามีสูงถึง 80.80 % นอกจากนี้ยังประกอบด้วย โปรตีน 3.54 % ไขมัน 0.39 % มีเยื่อใย 46.87 % เถ้าทั้งหมด 7.56 % มีพีเอช 5.69 มีไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในระดับต่ำ แต่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ โพลีแซคคาไรด์ที่แตกเปลี่ยนได้ แคลเซียมที่แตกเปลี่ยนได้ และแมกนีเซียมที่แตกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูง

2. การใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าเป็นวัตถุดิบในการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์จาก มูลไก่ มูลวัว และ มูลสุกร ได้เนื่องจากให้ผลใกล้เคียงกันทั้งเวลาเริ่มต้นในการเกิดก๊าซชีวภาพ จำนวนวันที่เกิดก๊าซชีวภาพ และ ปริมาตรก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น สำหรับเชื้อ พด.2 ให้ค่าต่ำ ส่วนชุดควบคุม (ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ใดๆ) ให้ค่าต่ำที่สุดทั้ง จำนวนวันที่เกิดก๊าซชีวภาพ และ ปริมาตรก๊าซชีวภาพที่เกิดขึ้น แต่ใช้เวลาเริ่มต้นในการเกิดก๊าซชีวภาพมากที่สุด

3. การใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสกัดชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ การเติมเชื้อ พด.2 ทำให้เวลาในการย่อยสลายของสารสกัดชีวภาพน้อยที่สุด และให้สารสกัดชีวภาพที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด ส่วนชุดควบคุม (ไม่ได้เติมจุลินทรีย์ใดๆ) ทำให้เวลาในการย่อยสลายของสารสกัดชีวภาพมากที่สุด ให้ค่าต่ำที่สุด และให้สารสกัดชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงมีปริมาณธาตุอาหารพืชต่ำ

4. การใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืช จากผลการทดลองพบว่าสามารถใช้ก้อนเชื้อเหาะเห็ดแครงเก่าปรับปรุงดินเพื่อการปลูกพืชได้โดยพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ ผักกวางตุ้ง และ มะเขือเปราะ เจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตสูงที่สุดในสิ่งทดลองที่ 1 และสิ่งทดลองที่ 4

## เอกสารอ้างอิง

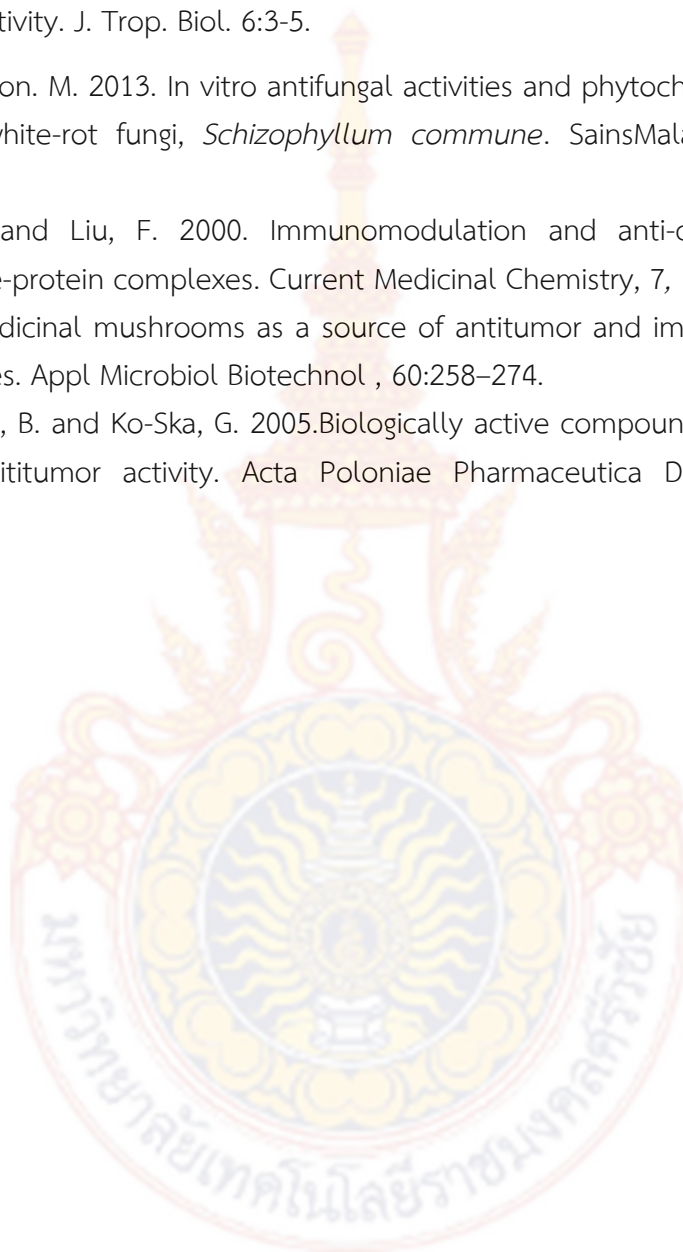
- กรมอาชีวศึกษา. 2552. ความหลากหลายของฟังไจ และบทบาทของฟังไจ. [ออนไลน์].แหล่งที่มา: <http://www.vcharkarn.com/lesson/view.php?id=1331> (31 มิถุนายน 2557).
- กัมปนาท และสัมฤทธิ์. 2557. วัสดุทดแทนขี้เลื่อยไม้ยางพาราสำหรับการเพาะเห็ด. ตามทันเกษตร ช่อง 7. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://sumritipol-farm>.
- กาญจณี เตชะวรวิทย์. 2556. เทคนิคการเพาะเห็ดแครง. วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีกระบี่. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.dailynews.co.th>. (1 มิถุนายน 2556).
- กานต์ สุขสุแพทย์จรรยา คงฤทธิ์และ ณหทัย วิจิตโรทัย. 2556. การใช้ได้ของกากกะทิเป็นอาหารเสริมในไก่เนื้อ. หลักสูตรสัตวศาสตร์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ. การประชุมวิชาการงานเกษตร นครสวรรค์ ครั้งที่ 10.[ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: [http://161.246.67.22/agri\\_officer/userfiles/files/55-71W-PA\\_174\\_181%205.pdf](http://161.246.67.22/agri_officer/userfiles/files/55-71W-PA_174_181%205.pdf).
- กัทลีวัลย์ สุขช่วยนิอร โฉมศรี และสุมาณี พรหมรุกชาติ. 2555. ศักยภาพของกิ่งไม้ใบไม้ที่มีในท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ดทดแทนขี้เลื่อยไม้ยางพารา. สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตรคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <https://mis.rmutl.ac.th>.
- กลุ่มวิจัยพัฒนารณาการเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (ตึกโภชนาการ) กรมวิชาการเกษตร. 2555. การเพาะเห็ดแครง. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.doa.go.th/biotech/pdf-document/sheet13.pdf>.
- โกสินทร์ แสงสว่างค์. 2547. การเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนโดยใช้เปลือกถั่วเขียว, ขี้เถ้า, ใส่นุ่น และทะเลสาปาล์ม น้ำมัน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://agri.vru.ac.th>.
- ขวัญจิต ชันปั้นแดง. 2547. การเพาะเห็ดกระด้างในถุงพลาสติกโดยเปรียบเทียบอาหารเสริมในปริมาณต่างกัน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://agri.vru.ac.th>.
- จิรศักดิ์ พิสิทธิ์พร. 2547. ปริมาณของรำ, แปะชนิดต่าง ๆ และข้าวโพดป่นที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดฟางในโรงเรือน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://agri.vru.ac.th>.
- ชมรมเกษตรปลอดสารพิษ. 2555. เตรียมตัวรับมือปัญหาขี้เลื่อย(วัตถุดิบทำก้อนเห็ด) ขาดตลาด. วันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2555 [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก:[www.thaigreenagro.com](http://www.thaigreenagro.com).
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2540. การเพาะเห็ดฟาง.[ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.ku.ac.th/agri/mush.htm>.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2549. การเพาะเห็ดเศรษฐกิจเพื่อการค้า. [ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/agri/mush.htm>. (1 มิถุนายน 2556).
- ธาดารี จีราพันธ์. 2543. อาหารและการให้อาหารสัตว์. นครสวรรค์ : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏนครสวรรค์.
- นิรนาม. 2550. แปรวัชพืชไร้ค่าเพื่อใช้ในการเพาะเห็ด. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://www.rde.biotec.or.th>.

- นฤมล มงคลธนะวัฒน์. 2557. เห็ดแครง: เห็ดพื้นบ้านที่มากด้วยคุณค่า.วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม-มิถุนายน 2557. สาขาเทคโนโลยีการจัดการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขต จันทบุรี.
- นฤมล สมคุณา จรัส สว่างทัฬหิโรประภา รอดจากเชื้อ และสุรศักดิ์ อุดรวิเชียร. 2556.การศึกษาเปรียบเทียบการเพิ่มระดับโปรตีนของกากมะพร้าวโดยกระบวนการหมักยีสต์และยูเรีย.สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
- นฤมล ไม้ทอง ชมภูษุข ส่งสิริฤทธิกุล ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ สิทธิรักษ์ รอยตระกูลและสุรลักษณ์ รอดทอง .2554. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากเห็ดรับประทานได้.การประยุกต์ใช้ MX วัน ศุ ก ร ที่ 03 มิถุนายน 2011 เวลา 14:21 น.สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน สถาบันมะเร็งแห่งชาติ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- นฤมล มงคลธนะวัฒน์. 2557.เห็ดแครง:เห็ดพื้นบ้านที่มากด้วยคุณค่า.วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. ปีที่ 23 ฉบับที่ 1เดือนมกราคม-มิถุนายน 2557. สาขาเทคโนโลยีการจัดการและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขต จันทบุรี.
- นันทนามุลมาตย์ศุภชัยอุตสาชน และกฤตพลสมมาตย์. 2553.การประเมินคุณค่าทางโภชนาและค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ของรำละเอียดกากเมล็ดนุ่นและกากมะพร้าวในโคเนื้อพื้นเมืองไทย. ภาควิชาสัตวศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่นจังหวัดขอนแก่น
- บรรณ บูรณะชนบท. 2547. คู่มือเพาะเห็ด. โรงพิมพ์เทพพิทักษ์, กรุงเทพฯ. 278 น.
- ปรีชา รัตน์ง. 2557. เห็ดยานางิ/เห็ดโคนญี่ปุ่น.ระบบข้อมูลพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร.
- ปัญญา โพธิ์ธิตีรัตน์. 2552. แหล่งผลิตเห็ดทั่วโลก. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. หน้า 14 – 16.
- พรศิลป์ สีเผือก และ คมสัน นันทสุนทร. 2548ก. ผลของเปลือกหมากแห้งต่อผลผลิตเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ในตะกร้า. รายงานการวิจัย. คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 36 หน้า.
- พรศิลป์ สีเผือก และ คมสัน นันทสุนทร. 2548ข. รายงานการวิจัย. การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มศักยภาพการเพาะเห็ดของชุมชน : กรณีศึกษาจังหวัดนครศรีธรรมราช. คณะเกษตรศาสตร์ นครศรีธรรมราช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 87 หน้า.
- พรศิลป์ สีเผือก. 2549. การใช้ก้อนเชื้อเก่าเป็นวัสดุเพาะเห็ดเป้าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus* O.K. Miller) และเห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.) ในถุงพลาสติก. คณะเกษตรศาสตร์ นครศรีธรรมราช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. 10 หน้า.
- วาริรัตน์ บุญเอก. 2549. เรื่องของเห็ด. ว. สถาบันอาหาร. 8: 75-76.
- ศิริวรรณ หิมพานต์. 2547. การเพาะเห็ดกระดาษในถุงพลาสติกโดยเปรียบเทียบอาหารเสริมในปริมาณแตกต่างกัน. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://agri.vru.ac.th>.
- สถาบันการแพทย์แผนไทย. 2542. ผักพื้นบ้านภาคใต้. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. 279 หน้า.

- สาธิต ไทยทัตกุลและลัดดา ปิยะวงศ์รุ่งเรือง. 2539. การเพาะเห็ด. ครั้งที่ 1.กรุงเทพฯ.[ออนไลน์] เข้าถึง ได้จาก:<http://www.dtam.moph.go.th/tcm/images/stories/research3.pdf>.
- สาวิตรี อ่ำคำ. 2547. การเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนโดยใช้สูตรอาหารเสริมที่มีแป้งชนิดต่างๆ. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก: <http://agri.vru.ac.th>.
- สุกัญญา จัดตุพรพงษ์. 2539. การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม .193หน้า.
- สุนตรา ชุมแวงวาปีศรีศักดิ์ สุนทรไชยและการุณ ทองประจุแก้ว. 2556. ผลของการตัดแปรกากมะพร้าว ด้วยวิธีการทางกายภาพต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตในหลอดทดลองของปลาเศรษฐกิจ.วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 16(3) : 106-167.
- สุทธิพันธ์ุ แก้วสมพงษ์ และ ศศิธร จินตนาสุนทรศิริ. 2546. การนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน มาทดลองเพาะเห็ด. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด. 8(3) : 7-14.
- แสงแก้ว คำกวน. 2548. การเพาะเห็ด. เอกสารประกอบการสอน. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน. 227 น.
- สมพงษ์ อังโษรัมย์. 2550. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตรการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเหลวและในเมล็ดธัญพืช.งานวิชาการเกษตร ศูนย์ศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ, 10 น.
- สำเนา ฤทธิ์นุช. 2557. เทคโนโลยีการเพาะเห็ดปี 2010.[ออนไลน์].แหล่งที่มา: <http://www.stou.ac.th/study/sumrit/6-55/page1-6-55.html>.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2548. เทคนิคการใช้หญ้าเพาะเห็ด ในประเทศจีน (ตอนที่ 1) ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด. 10 (1) :20-27.
- อานนท์ เอื้อตระกูล. 2551. เห็ด 3 อย่าง. [ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา:<http://mushroom.co.th> : 1 กันยายน 2555.
- อัจฉรา พัยพานนท์. 2548. วัสดุจากสับดำพืชพลังงานเพื่อเพาะเห็ดฟาง. ข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด. 10(2) : 17-30.
- AOAC. 1989. Official Methods of Analysis.14<sup>th</sup> ED. Assoc. of Official Analytical Chemists Inc., Virginia.
- Daba, A.S. and. Ezeronye, O.U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higherbasidiomycetes mushrooms. African Journal of Biotechnology, 2 (12), pp. 672-678.
- Mirfat, A. H. S., Noorlidah. A. andVikineswary. S, 2010. Scavenging activity of *Schizophyllum commune* extracts and its correlation to total phenolic content. J. Trop. Agri. Food Sci. 38 (2):231-238.
- Mirfat, A. H. S., Noorlidah. A. and Vikineswary. S, 2014. Antimicrobial activities of split gillmushroom *Schizophyllum commune* Fr. Am. J. Res. Com. 2(7):113-124.
- Narumon, S. 2008. Effects of dried coconut meal in the diet on growth performance of broilers. In: Proceeding 5<sup>th</sup> Symposium in Animal Science, January 31, 2008.



- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, KhonKaen University. Page 284-287.
- Naz, S. 2014. Health benefits of mushrooms. Online Inter. Interdisp. Res. J. IV:285-291
- Reyes, R. G., Grabl, W. and Rau, U. 2007. Mycelial wastes of *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from the biotechnological production of schizophyllan with antibacterial activity. J. Trop. Biol. 6:3-5.
- Teoh, Y. P. and Mat Don. M. 2013. In vitro antifungal activities and phytochemical analysis of filamentous white-rot fungi, *Schizophyllum commune*. SainsMalasiana 42(9):1267-1272.
- Vincent, E. Ooi, C. and Liu, F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. Current Medicinal Chemistry, 7, 715-729.
- Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuno modulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol , 60:258-274.
- Ziaja, K. S., Muszy-Ska, B. and Ko-Ska, G. 2005. Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research, 62 (2):153-160.



ภาคผนวก





ภาพภาคผนวกที่ 1 ประมวลภาพกิจกรรมโครงการฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า (ภายใต้แผนงานวิจัย “การเพิ่มผลผลิตเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) การใช้ประโยชน์สารทุติยภูมิจากเห็ดแครงในระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำ และการจัดการวัสดุก้อนเห็ดเก่า” (ประจำปีงบประมาณ 2559-2560)



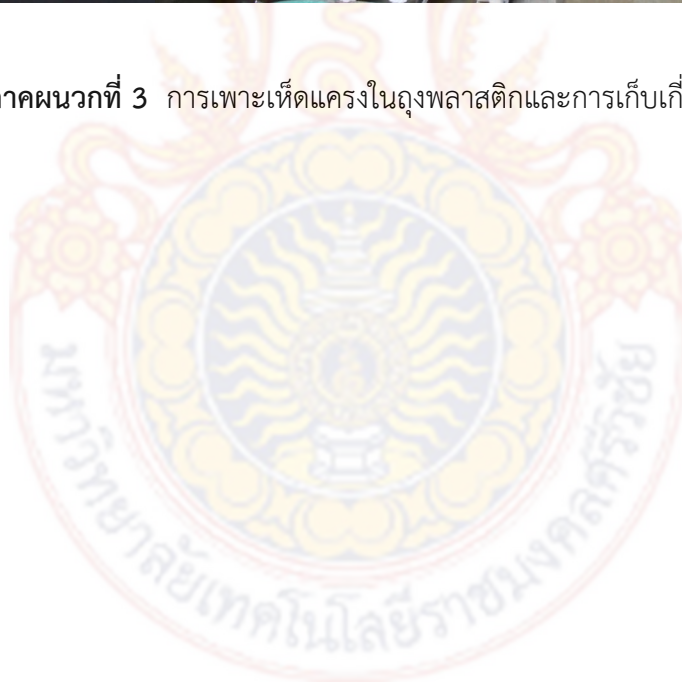


ภาพภาคผนวกที่ 2 ประมวลภาพกิจกรรมการย่อยก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่า เพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ และบรรจุใส่ถุงพลาสติกเพาะเห็ด





ภาพภาคผนวกที่ 3 การเพาะเห็ดแครงในถุงพลาสติกและการเก็บเกี่ยวผลผลิต







ภาพภาคผนวกที่ 4 ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่า





ภาพภาคผนวกที่ 5 การใช้ก้อนเชื้อเห็ดแครงเก่าผลิตสารสกัดชีวภาพและก๊าซชีวภาพ





ภาพภาคผนวกที่ 6 การใช้ก้อนเชื้อเห็ดเพาะเห็ดแครงเก่าปรับปรุงดินเพื่อการปลูกผักกางต้ง





ภาพภาคผนวกที่ 7 การใช้ก้อนเชื้อเพาะเห็ดแครงเก่าปรับปรุงดินเพื่อการปลูกมะเขือเปราะ

ภาพภาคผนวกที่ 8 การนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติโครงการวิจัยย่อยที่ 1



## Bag Cultivation of Split Gill Mushroom (*Schizophyllum commune*) by Application Coconut Meal Substitute Rice Bran

Chaisit Preecha\*, Wethi Wisutthiphaet, Pornsil Seephueak, and Siriwan Thongliumnak

Tropical Fruit Crop and Tree Research Center, Department of Plant Science, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat, 80110, Thailand

Preecha C., Wisutthiphaet W., Seephueak P. and Thongliumnak S. (2016). Bag Cultivation of Split Mushroom (*Schizophyllum commune*) by Application Coconut Meal Substitute Rice Bran. *Journal of Agricultural Technology*. 12(7.2):2073-2077.

Rice meal was used as the major nutrition adding on mushroom culture media. This research trial to use coconut meal substituted the higher price rice bran. In vitro test of mycelium growth on medium in Petri dish with different substitution ratio of rice bran by coconut meal was done. Ratio of rice bran: coconut meal was varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 and 0: 100 % respectively. The result showed that mycelium growth diameter after 7 days was 8.96, 7.68, 8.74, 8.94 and 7.07 cm respectively. The same ratio was culture as spawn bag at greenhouse; the result showed that yield of the substitution ratio above was 46.09, 25.96, 32.54, 41.21 and 49.96 g/bag respectively. Although, 100% coconut meal substitution showed the lowest growth in vitro test but it gave the highest yield with the good smell.

**Keywords:** split gill mushroom, coconut meal, rice bran

### Introduction

Split gill mushroom, *Schizophyllum commune* was found in worldwide at tropical forest. Normally, it could be collected from natural or cultivated as commercial especially in Thailand. Beside it was food cooking for Mexican and Asian, several report confirmed for medicinal benefit of this mushroom. Lentinan, schizophyllan, genodaran, cordycepin, cordycepic acid and protein-bound polysaccharide were extract from *Schizophyllum commune* (Daba and Ezeronye, 2003; Vincent *et al.*, 2000; Wasser, 2002; Ziaja *et al.*, 2005). Polysaccharide schizophyllan (1,3  $\beta$  glucan) have been confirmed to inhibit sarcoma 180 cancer (Joshi *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2000). In Thailand, this mushroom was high demand for food cooking because it's tasty and healthy

\* Coresponding Author: UnartgamJ., E-mail address: [skpreecha@yahoo.co.uk](mailto:skpreecha@yahoo.co.uk)



information. Some substrate from agricultural byproduct was tested using in culture medium. In culture medium, rice bran was used as source of protein and essential nutrition for mushroom culture (Auetragul, 2008). Rice bran was used in feeding industry and the price was high. In evaluation nutritive value and metabolizable energy of rice bran and coconut meal showed of digestible energy 14.68, and 11.18 MJ ME/kg, metabolizable energy 12.35 and 9.93 MJ ME/kg, nitrogen free extract 42.56 and 41.64 MJ ME/kg (Nantana *et al.*, 2010). Both of them were enriching nutrient composition which favorable for mushrooms growing. In this research was trial to used coconut meal substitute of rice bran on spawn culture medium of *Schizophyllum commune*.

### Materials and methods

*Schizophyllum commune* in this research was a commercial strain. *In vitro* test was done by grow mycelium on medium in Petri dish with different substitution ratio of rice bran by coconut meal. The ratio of rice bran: coconut meal was varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, and 0: 100 % respectively. Mycelium cultured on PDA was transferred on Petri dish and incubated at room temperature. Mycelium growth diameter was measured after incubation for 3, 5 and 7 days.

In greenhouse trial, mother spawn was done by transferred mycelium cultured on PDA to sterilized sorghum and incubated for 14 days or until sorghum grain covering with mycelium before transferred to spawn bag. Spawn bag was prepared from mixing of rubber tree sawdust with rice bran, pumice, magnesium sulfate, and water (100: 50: 2: 0.2: 75). Rice bran was substituted with different ratio of coconut meal. Ratio of rice bran: coconut meal was varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 and 0: 100 % respectively. Coconut meal was dried up at 60 C for 48 hours before mixed in media. The mixing media was packed in polypropylene bag (600 g/bag). After sterilization and leaved for 2 days, spawn bag was punched from the top to the middle of bag for mother spawn inoculation. Mother spawn previously prepared was inoculated to spawn bag at the punching well. The inoculated spawn bags were leaved at ambient in incubation room. After incubation for 20 days, mycelium full colonized on substrate, spawn bags cut in 4 vertical stripes (Preecha, 2014) and brought to stimulate basidiocarp in greenhouse. Weigh, size, number of basidiocarp was recorded and submitted to analysis with Completely Randomized Design statistical analysis to compare produce of medium at different ratio substituted of coconut meal. Cost and return were calculated (Preecha, 2010 and Pipathsithee, 2001).



## Results

*In vitro* test for mycelium growth on medium in Petri dish with different substitution ratio of rice bran by coconut meal, the result indicated that mycelium of *Schizophyllum commune* grow well on medium with the highest ratio of rice bran: coconut meal (100:0) of 3.45, 5.99, and 8.96 cm of mycelium diameter after incubation for 3, 5 and 7 days respectively. While, this mushroom cultured on medium with the highest coconut meal (0:100), it grow slowest of 2.74, 4.28, 7.07 cm of mycelium diameter incubation for 3, 5 and 7 days (Table 1).

**Table 1** Mycelium growth diameter of *Schizophyllum commune* cultivated on Petri dish at different substitution ratio of rice bran by coconut meal varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 and 0: 100 % incubation for 3, 5 and 7 days

Substitution ratio (%)	Mycelium growth diameter )cm( <sup>V</sup>		
	3-day	5-day	7-day
Rice bran: coconut meal,100 :0	3.45a	5.99a	8.96a
Rice bran: coconut meal, 75:25	2.98d	4.54d	7.68d
Rice bran: coconut meal, 50:50	3.01c	5.75c	8.74c
Rice bran: coconut meal, 25:75	3.10b	5.96b	8.94b
Rice bran: coconut meal, 0:100	2.74e	4.28e	7.07e

<sup>V</sup> =Means with the same letter in the same column are not significantly different at 0.05 DMRT mean comparison

In greenhouse trial, spawn bag prepared from mixing of rubber tree sawdust with rice bran substituted with different ratio of coconut meal, result showed that yield produced on rice bran: coconut meal (0:100) was the highest of 49.96 g/bag. It was higher yield than cultured on medium with the highest ratio of rice bran: coconut meal (100:0) of 46.09 g/bag (Table 2). *In vitro* test, the mycelium cultured on rice bran: coconut meal (0:100) unlikely grow well, but the yield was excellent produced at this ratio. When compared the yield component of mushroom in this ratio, all components (basidiocarp number, wide and length) at Table 2 was lowest, but this medium ratio produced the 2 time thicker basidiocarp (data not shown). Also testy and smell of it was better than other.

**Table 2** Yield component of *Schizophyllum commune* cultivated on different substitution ratio of rice bran by coconut meal varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 25: 75 and 0: 100 %.

Substitution ratio (%)	Yield component(/bag) <sup>1/</sup>			
	Weigh (g)	basidiocarp (no.)	Wide (cm)	Length (cm)
Rice bran: coconut meal, 100:0	46.09b	116.77a	1.35d	2.02c
Rice bran: coconut meal, 75:25	25.96e	93.93b	1.37c	2.01d
Rice bran: coconut meal, 50:50	32.54d	97.72c	1.48b	2.07b
Rice bran: coconut meal, 25:75	41.21c	88.82d	1.57a	2.17a
Rice bran: coconut meal, 0:100	49.96a	53.34e	0.95e	1.70e

<sup>1/</sup> =Means with the same letter in the same column are not significantly different at 0.05 DMRT mean comparison

Cost and return of all medium ratio was calculated to make decision for the proper ratio which gave the high profit. The financial analysis result revealed that culture medium with the ratio of rice bran: coconut meal (0:100) was the lowest cost of 0.04 USD/bag or 0.88 USD/kg of produce with the highest income of 0.29 USD/bag and also gave the highest net profit 4.83 USD/kg. While, culture medium with the ratio of rice bran: coconut meal (100:0) was the highest cost of 0.08 USD/bag or 1.77 USD/kg with net profit of 3.95 USD/kg. It was lower than culture medium with the ratio of rice bran: coconut meal (25:75) and also rice bran: coconut meal (0:100) (Table 3). In this research should be confirmed the farmer to selected coconut meal substitute rice bran for spawn medium.

**Table 3** Cost of yield per kg of *Schizophyllum commune* cultivated on different substitution ratio of rice bran by coconut meal varied to 100: 0, 75: 25, 50: 50, and 0: 100 %. (USD)

Substitution ratio (%)	Cost (g/bag)	Income/bag <sup>1/</sup>	Cost/kg	Net profit/kg
Rice bran: coconut meal, 100:0	0.08	0.26	1.77	3.95
Rice bran: coconut meal, 75:25	0.07	0.15	2.78	2.93
Rice bran: coconut meal, 50:50	0.06	0.19	1.93	3.78
Rice bran: coconut meal, 25:75	0.05	0.24	1.30	4.41
Rice bran: coconut meal, 0:100	0.04	0.29	0.88	4.83

Rate of currency of exchange = 35.01 Thai Baht to 1USD

1/ = Income calculation base on yield of *Schizophyllum commune* at price 5.71 USD/kg (200 Thai B/kg)

## References

- Auetragul, A. 2008. Three mushroom. Available on: <http://mushroom.co.th>
- Daba, A. S., and Ezeronye., O. U., 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *Afr J Biotechnol.* 2: 672-678.
- Joshi, M., Patel, H., Gupte, S., and Gupte, A. 2013. Nutrient improvement for simultaneous production of exopolysaccharide and mycelial biomass by submerged cultivation of *Schizophyllum commune* AGMJ-1 using statistical optimization. *Biotechnol.* 3:307–318.
- Moonmat, N., Otsuka, M., Udchachon, S. and Sommart, K. 2010. Nutritive value and metabolizable energy evaluation of rice bran, kapok seed meal and coconut meal in Thai native beef cattle *J Sci Technol.* 29(4): 382-388.
- Pipathsithee, C. 2001. Economic project analysis. Department of Economics, Faculty of Economics, Kasetsart University.
- Preecha, C. and Thongliumnak, S. 2015. Bag opening technique for bag spawn culture of spit gill (*Schizophyllum commune*). *J Agric Technol.* 11(2): 367-372.
- Preecha, S. 2010. Principles of Accounting. Triple Education Co. Ltd. Bangkok. 568 p.
- Vincent, E., Ooi, C. and Liu, F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem.* 7: 715-729.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immuno modulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biot.* 60: 258–274.
- Ziaja, K. S., Muszy-Ska, B. and Ko-Ska, G. 2005. Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 62: 153-160.

ภาพภาคผนวกที่ 9 การนำเสนอผลงานในระดับชาติโครงการวิจัยย่อยที่ 1







**RUCA IV**  
Faculty of Agricultural Technology @ pbru



## บทคัดย่อ

ครั้งที่

**4**

### การนำเสนอผลงาน ทางวิชาการระดับปริญญาบัณฑิต ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

เทคโนโลยีการเกษตร : เกษตร ตามรอยพ่อหลวง

The 4<sup>th</sup> Regional Undergraduate Conference  
on Agricultural Science and Technology (RUCA IV)



30 - 31 มีนาคม 2560



การเปรียบเทียบกากมะพร้าวสดกับกากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด

ในสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในถุง

ชนิกานต์ สุขสวัสดิ์ บงกชกร ดิษฐ์แก้ว และ ชัยสิทธิ์ ปรีชา

สาขาวิทยาศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช 80110

E-mail: chonnikarn.0258@gmail.com

### บทคัดย่อ

การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวสดเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยมีอัตราส่วนของกากมะพร้าวสดและแห้งร่วมกับรำข้าวละเอียด 5 ระดับ ผลการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าการเจริญของเส้นใยมีความแตกต่างกันทั้งหลังการเพาะเลี้ยง 3 5 และ 7 วัน ( $p < 0.5$ ) โดยการเจริญของเส้นใยหลังจากเลี้ยงบนอาหาร 7 วัน พบว่าอัตราส่วนกากมะพร้าวสด/แห้ง: รำข้าวละเอียด 0:100 เห็ดแครงเจริญได้ดีที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 8.96 เซนติเมตร เส้นใยเจริญได้ดีกว่าสูตรของกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 และ กากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 8.94 และ 8.89 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพการผลิตในถุงพลาสติก พบว่า สูตรกากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีผลผลิตเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 49.96 กรัมต่อก้อน รองลงมาคือกากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 0:100 และกากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 50:50 มีผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 46.09 และ 41.21 กรัมต่อก้อน ตามลำดับ โดยมีต้นทุนต่อถุงของสูตรที่ให้ผลสูงสุด และรองลงมาคือสูตรกากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 กากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 0:100 และกากมะพร้าวอบแห้ง: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 50:50 มีต้นทุน 1.88, 2.21 และ 2.85 บาทต่อก้อน ตามลำดับ มีรายรับ 9.99, 8.24 และ 9.22 บาทต่อก้อนตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากากมะพร้าวอบแห้งสามารถนำมาทดแทนรำข้าวที่มีราคาแพงได้

**คำสำคัญ:** เห็ดแครง กากมะพร้าวสด กากมะพร้าวแห้ง รำข้าวละเอียด

**Comparison of spawn culture material between fresh coconut meal and dry coconut meal to substitute rice bran for bag spawn cultivation split gill mushroom (*Schizophyllum commune*)**

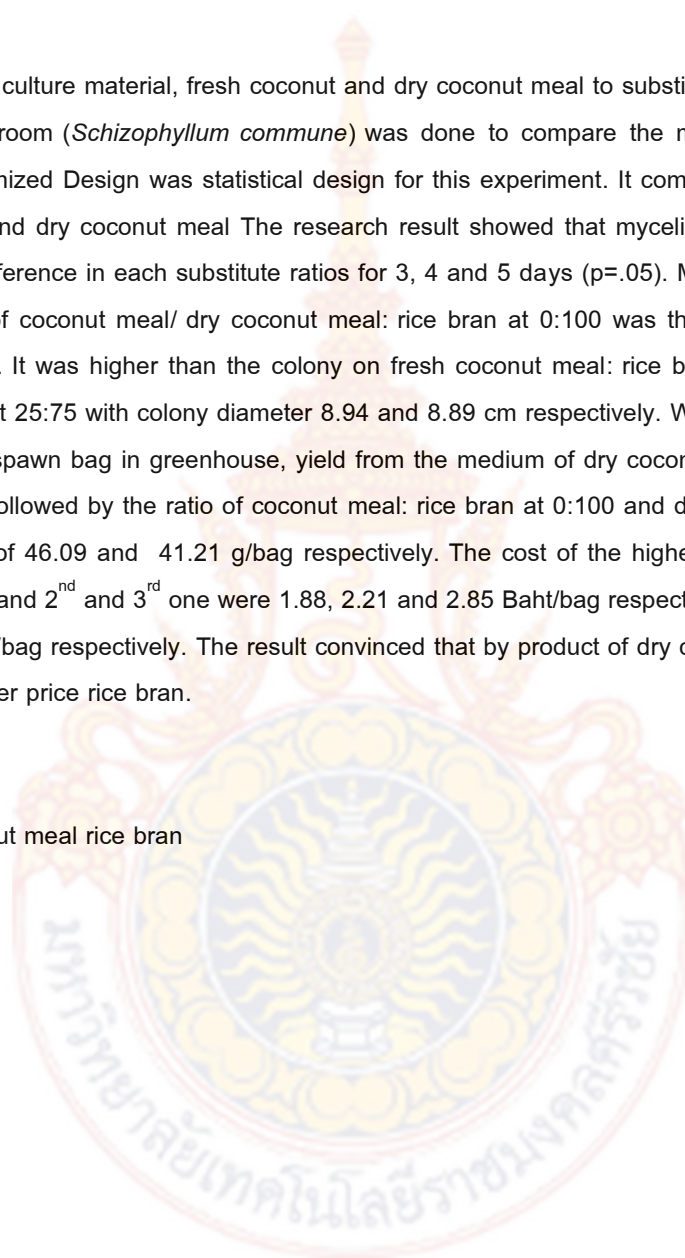
**Chonnikarn Suksawat, Bongkochakorn Ditkaew and Chaisit Preecha**

**E-mail: chonnikarn.0258@gmail.com**

**Abstract**

To develop spawn culture material, fresh coconut and dry coconut meal to substitute rice bran for bag cultivation split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) was done to compare the mycelium growth and yield. Completely Randomized Design was statistical design for this experiment. It comprised of the 5 ratios of rice bran and fresh and dry coconut meal. The research result showed that mycelium growth on media culture in Petridis was difference in each substitute ratios for 3, 4 and 5 days ( $p=.05$ ). Mycelium growth after 7 day cultured on ratio of coconut meal/ dry coconut meal: rice bran at 0:100 was the highest growing of colony diameter 8.96 cm. It was higher than the colony on fresh coconut meal: rice bran at 25:75 and dry coconut meal: rice bran at 25:75 with colony diameter 8.94 and 8.89 cm respectively. When cultured split gill mushroom on media as spawn bag in greenhouse, yield from the medium of dry coconut meal: rice bran at 25:75 was 49.96 g/bag, followed by the ratio of coconut meal: rice bran at 0:100 and dry coconut meal: rice bran at 50:50 with yield of 46.09 and 41.21 g/bag respectively. The cost of the highest yield (dry coconut meal: rice bran at 25:75) and 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> one were 1.88, 2.21 and 2.85 Baht/bag respectively and return were 9.99, 8.24 and 9.22 Baht/bag respectively. The result convinced that by product of dry coconut milk could be used to substitute of higher price rice bran.

**Keyword:** Split gill coconut meal rice bran





## บทนำ

เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Schizophyllum commune* มีชื่อสามัญว่า split gill (Alexopoulos *et al.*, 1996) เป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ทั่วโลกและพบได้ตลอดปีในช่วงที่มีความชื้นพอ พบขึ้นอยู่กับวัสดุหลายชนิด เช่น ท่อนไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ใบหญ้า ในภาคใต้ของไทยพบมากบนท่อนไม้ยางพารา ที่ตัดโค่นไว้เมื่อท่อนไม้ตายและมีฝนตกก็พบเห็ดแครงขึ้นเป็นจำนวนมากเห็ดแครงเป็นเห็ดที่สามารถเพาะได้ง่ายและรวดเร็ว วัสดุเพาะที่มีความหลากหลาย สามารถเก็บรักษาเห็ดสดได้ทนนาน โดยคงรูป คงรส และกลิ่น ทำแห้งเก็บได้นานไม่เน่าเสีย สามารถคืนรูปได้เช่นเดียวกับเห็ดหูหนู มีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งอาหารและยา สามารถชะงักเซลล์มะเร็งและเนื้องอก เนื่องจากมีสาร Schizophyllan และ Mucoitin โดยผลจากการทดลองกับหนูได้ผลถึง 70-100 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งมีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับเห็ดนางรม นางฟ้า เห็ดฟางที่มีขายในท้องตลาด ราคาจำหน่ายดอกสด กิโลกรัมละ 80-150 บาท เห็ดแห้งกิโลกรัมละ 400-500 บาท (กรมวิชาการเกษตร, 2556)

การเพาะเห็ดในปัจจุบัน เป็นการเพาะแบบเลียนธรรมชาติ ด้วยการนำเอาวัสดุเศษซากพืชมาเป็นวัสดุเพาะ เช่น ฟาง หญ้า ต้นข้าวโพด ชังข้าวโพด ชานอ้อย ชีเสื่อย เป็นต้น ซึ่งวัสดุต่างๆเหล่านี้มีธาตุอาหารที่เห็ดต้องการครบ ได้แก่ สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) สารประกอบที่เป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) และธาตุอาหาร (nutrient) (กัมปนาท และสัมฤทธิ์, 2557; มนตรี, 2556) แต่เห็ดถือว่าเป็นพืชชั้นต่ำ มันไม่สามารถนำธาตุอาหารบางอย่างในรูปสารเคมีเอาไปใช้ได้เช่นพืช แต่จะเอาไปใช้ได้ในรูปแบบของสารโปรตีนที่มีอยู่ในพืชหรือยีสต์เท่านั้น เช่น โปรตีนในรำละเอียด สาเหล้ม กระจินป่น เป็นต้น ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญที่ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเสริมสำเร็จรูปที่เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันนี้ (อานนท์, 2551; รัฐพล และสยาม, 2557)

รำละเอียดมีราคาเพิ่มสูงขึ้น ประกอบกับรำละเอียดขาดคุณภาพ มีเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนต่ำลง เพราะมีการเพิ่มปริมาณเปลือกเมล็ดข้าวหรือแกลบเข้าไปมากยิ่งขึ้น แม้ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณรำละเอียดให้มากยิ่งขึ้นเป็นส่วนผสมของวัสดุเพาะ แต่ผลผลิตไม่ได้สูงเพิ่มขึ้น กลับทำให้การปนเปื้อนของเชื้อโรคกลับสูงขึ้น จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนมาใช้รำละเอียดจากข้าวสาลี อันเป็นแหล่งอาหารโปรตีน เกลือแร่วิตามินให้แก่เห็ดได้ดีกว่ารำข้าวทั้งข้าวเหนียวและข้าวนอกจากนี้ใบกระจินก็สามารถนำมาใช้แทนรำข้าวได้แต่ถูกควบคุมการผลิตให้ใช้ใบและก้านอ่อนมีโปรตีนสูงกว่า 21% (สูงกว่ารำ 3 เท่า) และสาเหล้ม ซึ่งส่วนใหญ่เป็นซากของตะกอนเชื้อยีสต์ที่อุดมไปด้วยโปรตีน (ปกติยีสต์ประกอบไปด้วยโปรตีน 56%) และวิตามินบี 1 สูงมาก ดังนั้น การใช้สาเหล้มใส่เข้าไปเป็นอาหารเสริมเห็ดนั้น สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของดอกเห็ดได้เป็นอย่างดี และยังช่วยลดปริมาณการใช้รำละเอียดได้อีกด้วย กล่าวคือ สาเหล้มแห้ง 1 กิโลกรัม ใช้แทนรำละเอียดได้ 2 กิโลกรัม ปริมาณสาเหล้มที่แนะนำให้ใช้ในอัตรา 2-3 กิโลกรัมต่อวัสดุเพาะ (แห้ง) 100 กิโลกรัม นอกจากนี้ ยังมีปุ๋ยที่ใช้สำหรับการเพาะเห็ดโดยตรง อันได้แก่ ปุ๋ยขาว ใช้สำหรับการหมักวัสดุเพาะในระยะแรก ปุ๋ยโดโลไมท์ สำหรับผสมวัสดุเพาะเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดหูหนู เห็ดเป่าฮื้อ ปุ๋ยยิบซั่ม สำหรับเห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดลม เห็ดหลินจือ เห็ดโคนญี่ปุ่น รวมทั้งหินฟอสเฟตจากมูลค้างคาวที่ผสมกันนับล้านปีจนเป็นหิน ถูกนำมาบดให้ละเอียด สำหรับเสริมสร้างความแข็งแรง และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเส้นใยเห็ดเพิ่มขึ้นเมื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาและค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ของรำละเอียดและกากมะพร้าวในการเลี้ยงโคเนื้อพื้นเมืองของไทย พบว่ารำละเอียดและกากมะพร้าว มีคุณค่าทางโภชนาที่ย่อยได้รวมทั้งหมด 74.29 และ 51.97% ค่าพลังงานที่ย่อยได้ เท่ากับ 14.68 และ 11.18 เมกะจูลต่อกิโลกรัมและค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้เท่ากับ 12.35 และ 9.93 เมกะจูลต่อกิโลกรัม (นันทนา และคณะ, 2553) ดังนั้นการพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงโดยการนำกากมะพร้าวมาทดแทนรำข้าวละเอียดน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการทดสอบวัสดุเพาะเห็ด เพื่อลดต้นทุนการผลิตสามารถเพิ่มผลกำไรและค่าตอบแทน ดังนั้นการใช้กากมะพร้าวทดแทนรำข้าวละเอียดน่าจะช่วยลดต้นทุนได้เป็นอย่างดีและเป็นการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

## วิธีการ

### 1. การศึกษาอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าวสดเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวอบแห้งต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแครง ในห้องปฏิบัติการ

#### 1.1 การเตรียมเชื้อเห็ด

เส้นใยเห็ดแครงจากกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บริเวณรอบนอกสุดของโคโลนีเพื่อเป็นกล้าเชื้อเห็ด

#### 1.2 การเพิ่มกล้าเชื้อเห็ด

เมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมากรองด้วยตะแกรงฟุ้งให้สะเด็ดน้ำแล้วต้มในน้ำเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยตะแกรงแล้วฟุ้งให้เย็น จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างบรรจุในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 2 ใน 3 ของขวด นำไปนึ่งห่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นลง เชื้อกล้าเชื้อเห็ดจากข้อ 1.1 ลงไปจำนวน 2 ชิ้น แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จะได้กล้าเชื้อเห็ดที่เจริญในเมล็ดข้าวฟ่างตามที่ต้องการ

#### 1.3 การเตรียมวัสดุเพาะเห็ด

น้ำซีลี้อยไม่ย่างพาราผสมกับวัสดุเสริมที่นำมาทดแทนรำข้าวละเอียด ปรับความชื้นให้ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องวัดความชื้น แล้วนำวัสดุเพาะใส่จานเพาะเชื้อปริมาณ 20 กรัมต่อจาน ตามสูตร ตารางที่ 1 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วถ้ายกกล้าเชื้อเห็ด จำนวน 1 เมล็ด วางไว้กึ่งกลางจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สูตรเพาะเห็ดแครงในจานเพาะเชื้อ

สูตร	วัสดุหลัก (%)	วัสดุเสริมทดแทนรำข้าวละเอียด (%)	วัสดุเสริมอื่นๆ (%)
1	ซีลี้อยไม่ย่างพารา 100	รำข้าวละเอียด 100	ภูไม้ 2 ดีเกลือ 0.2 น้ำสะอาด 80
2		กากมะพร้าวอบแห้ง 100	
3		กากมะพร้าวอบแห้ง 75 + รำข้าวละเอียด 25	
4		กากมะพร้าวอบแห้ง 50 + รำข้าวละเอียด 50	
5		กากมะพร้าวอบแห้ง 25 + รำข้าวละเอียด 75	
6		กากมะพร้าวสด 100	
7		กากมะพร้าวสด 75 + รำข้าวละเอียด 25	
8		กากมะพร้าวสด 50 + รำข้าวละเอียด 50	
9		กากมะพร้าวสด 25 + รำข้าวละเอียด 75	

#### 1.4 การบันทึกผลการทดลอง

ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ด สีของเส้นใยเห็ด การเจริญของเส้นใยเห็ดเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะ และสังเกตความหนาแน่นของเส้นใยเห็ด

#### 1.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 9 สิ่งทดลอง สิ่งทดลองละ 10 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## 2. ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเห็ดแครงในถุงพลาสติก

### 2.1 การเตรียมก้อนเชื้อเห็ดในถุงพลาสติก

นำสูตรจากตารางที่ 1 มาบรรจุถุงพลาสติกทึบร้อนแบบพับกัน ขนาด 6.5 X 10 นิ้ว หนักประมาณ 500 กรัมต่อก่อน ให้นำปากถุงไว้สำหรับสวมคอขวดพลาสติกเพื่อการเขี่ยเชื้อภายหลัง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ขึ้นอยู่กับลักษณะของหม้อและปริมาณก้อนเชื้อ) หรือหนึ่งด้วยหม้อหนึ่งแบบลูกทุ่งใช้เวลา 3-4 ชั่วโมง ไฟแรงสม่ำเสมอ หลังจากหนึ่งเรียบร้อยแล้วนำก้อนเชื้อออกมาวางเรียงกัน รอนกระทั่งก้อนเชื้อเย็น จึงสามารถเขี่ยหัวเชื้อจาก เมล็ดข้าวฟ่างต่อไปได้

### 2.2 การถ่ายกล้าเชื้อเห็ดและบ่มก้อนเชื้อเห็ด

ถ่ายกล้าหัวเชื้อ จำนวน 10-15 เมล็ด ลงก้อนเชื้อเห็ด จากนั้นจึงรีบปิดด้วยกระดาษปิดทับทันที นำไปบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 15-20 วัน เส้นใยเห็ดเจริญเต็มก้อนเชื้อ ซึ่งหลังจากเส้นใยเต็มก้อนเชื้อจึงให้แสงในโรง บ่ม ซึ่งแสงจะกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกจะสังเกตเห็นเส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจึงนำไปเปิดดอก

### 2.3 การเปิดดอก

นำก้อนเชื้อเห็ดแครงที่เส้นใยเจริญเต็มถุงมาทำการเปิดดอก โดยดึงฝาจากออกและรัดปากถุงให้แน่นด้วยยาง วง จากนั้นกรีดข้างถุงในแนวตั้ง จำนวน 4 รอย รอบถุง แต่ละรอยมีความยาว 2 นิ้ว วางก้อนเชื้อแนวตั้ง ในโรงเปิดดอก เห็ดที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการรดน้ำวันละ 2 ครั้งเช้าและเย็นด้วยสายยางที่สวมหัวฉีดแบบพ่นฝอย (หารรดน้ำมากเกินไปก้อนเห็ดจะดูดน้ำเข้าไปทำให้ก้อนเชื้อเสียและปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น) แล้วเก็บผลผลิตดอกเห็ดรุ่น ที่ 1 ได้หลังจากนั้นเห็ดจะพักตัว ทำการรดน้ำและเก็บรุ่นที่ 2 อีกประมาณ 7 วัน

### 2.4 การบันทึกผลการทดลอง

การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) หลังใส่หัวเชื้อ ผลผลิตรวมทั้งหมด จำนวนดอก ความ กว้างดอก ความยาวดอก คำนวณหาต้นทุนและผลตอบแทนการเพาะเห็ดแครงในอัตราส่วนของกากมะพร้าวสดต่อกาก มะพร้าวแห้งและอัตราส่วนรำข้าวละเอียดในแต่ละการทดลอง

## ผลและอภิปรายผล

**การศึกษาอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าวสดเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวอบแห้งต่อการ เจริญของเส้นใยเห็ดแครง ในห้องปฏิบัติการ**

จากการศึกษาอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว จำนวน 9 สูตร คือ สูตรที่ 1 อาหารทั่วไปใน การเพาะเห็ดแครง (อัตรารำข้าวละเอียด 100 เปอร์เซ็นต์) สูตรที่ 2 กากมะพร้าวอบแห้ง 100 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ใส่รำ ละเอียด) สูตรที่ 3 กากมะพร้าวอบแห้ง 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 25 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 4 กากมะพร้าว อบแห้ง 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 50 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 5 กากมะพร้าวอบแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำ ข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 6 กากมะพร้าวสด 100 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ใส่รำละเอียด) สูตรที่ 7 กากมะพร้าวสด 75 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 25 เปอร์เซ็นต์ สูตรที่ 8 กากมะพร้าวสด 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 50 เปอร์เซ็นต์ และสูตรที่ 9 กากมะพร้าวสด 25 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับรำข้าวละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเจริญของ เส้นใยเห็ด เมื่อเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสูตรที่ 1 ถึง 5 ในจานเพาะเชื้อ พบว่าการเจริญของโคโลนีแตกต่างกันและมีอัตรา การเจริญของเส้นใยในวันที่ 3 5 และ 7 พบว่า ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสีขาวฟู และสามารถเจริญได้เต็มผิววัสดุ เมื่อเทียบกับสูตรที่ 1 พบว่าสูตรที่ 4 5 8 และ 9 ใช้เวลาถึง คือ 7 วัน และสูตรที่ 2 3 6 และ 7 ใช้เวลา 9 วัน ตามลำดับ และความหนาแน่นของเส้นใยพบว่าในสูตรที่ 1 4 5 8 และ 9 มีเส้นใยเจริญหนาแน่นมาก ส่วนสูตรที่ 2 3 6 และ 7 ลักษณะเส้นใยหนาแน่นปานกลาง (ตารางที่ 2 และตารางที่ 3)



**ตารางที่ 2** ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเห็ดแครงเจริญบนวัสดุเพาะต่างๆ ในจานเพาะเชื้อที่อายุ 3 5 และ 7 วัน

สูตร	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)		
	อายุ 3 วัน	อายุ 5 วัน	อายุ 7 วัน
1. รำข้าวละเอียด 100%	3.45 <sup>a</sup>	5.99 <sup>a</sup>	8.96 <sup>a</sup>
2. ปากมะพร้าวอบแห้ง 100%	2.74 <sup>h</sup>	4.28 <sup>i</sup>	7.07 <sup>i</sup>
3. ปากมะพร้าวอบแห้ง 75% + รำข้าวละเอียด 25%	2.98 <sup>f</sup>	4.54 <sup>h</sup>	7.68 <sup>g</sup>
4. ปากมะพร้าวอบแห้ง 50% + รำข้าวละเอียด 50%	3.01 <sup>e</sup>	5.75 <sup>e</sup>	8.74 <sup>d</sup>
5. ปากมะพร้าวอบแห้ง 25% + รำข้าวละเอียด 75%	3.10 <sup>d</sup>	5.96 <sup>b</sup>	8.94 <sup>b</sup>
6. ปากมะพร้าวสด 100%	2.79 <sup>g</sup>	4.60 <sup>g</sup>	7.57 <sup>h</sup>
7. ปากมะพร้าวสด 75% + รำข้าวละเอียด 25%	3.01 <sup>e</sup>	5.23 <sup>f</sup>	8.60 <sup>f</sup>
8. ปากมะพร้าวสด 50% + รำข้าวละเอียด 50%	3.20 <sup>c</sup>	5.35 <sup>d</sup>	8.73 <sup>e</sup>
9. ปากมะพร้าวสด 25% + รำข้าวละเอียด 75%	3.35 <sup>b</sup>	5.80 <sup>c</sup>	8.89 <sup>c</sup>

หมายเหตุ: ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

**ตารางที่ 3** ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงเจริญเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะสูตรต่างๆ ในจานเพาะเชื้อ

สูตร	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ด	
	สี	การเจริญของเส้นใยเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะ (วัน)
1		7
2		9
3		
4		7
5	ขาว	9
6		
7		9
8		
9		7

หมายเหตุ : + ความหนาแน่นของเส้นใยน้อย

++ ความหนาแน่นของเส้นใยกึ่งกลาง

+++ ความหนาแน่นของเส้นใยมาก

### ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเห็ดแครงในถุงพลาสติก

จากตารางที่ 4 ศึกษาการพัฒนาวัสดุเพาะเห็ดแครงด้วยอัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าวสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดแครง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ 1) กากมะพร้าวแห้งที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด และ 2) กากมะพร้าวสด และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด ผลการทดลองดังต่อไปนี้

การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) หลังใส่หัวเชื้อ พบว่า สูตรที่ 1 มีการเจริญของเส้นใยในก้อนเชื้อเห็ดแครง เท่ากับ 10.41 เซนติเมตร รองลงมาคือ สูตรที่ 4, 8, 9, 5, 7, 3, 6 และ 2 การเจริญของเส้นใยในก้อนเชื้อเห็ดแครง เท่ากับ 9.16, 8.98, 8.86, 8.75, 7.86, 7.60, 6.28 และ 5.62 เซนติเมตร ตามลำดับ

ผลผลิตรวมทั้งหมด โดยชั่งน้ำหนักจำนวนดอกเห็ดของแต่ละขนาดผล พบว่า สูตรที่ 5 ให้ผลผลิตรวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 49.96 กรัมต่อก้อน รองลงมาคือ สูตรที่ 1, 4, 8, 9, 7, 3, 6 และ 2 ให้ผลผลิตรวมทั้งหมด คือ 46.09, 41.21 38.27, 37.30, 32.98, 32.54, 31.06 และ 20.95 กรัมต่อก้อน ตามลำดับ

จำนวนดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรที่ 1 มีจำนวนดอกเห็ดแครงมากที่สุด คือ 116.77 ดอกต่อก้อน รองลงมาคือ สูตรที่ 3, 2, 9, 4, 8, 7, 5 และ 6 มีจำนวนดอกเห็ด 96.72, 93.93, 89.85, 88.82, 71.38, 60.93, 53.35 และ 52.65 ดอกต่อก้อน ตามลำดับ

ความกว้างดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรที่ 8 มีความกว้างดอกมากที่สุด คือ 2.02 เซนติเมตรต่อดอก รองลงมาคือ สูตรที่ 7, 9, 6, 4, 3, 2, 1 และ 5 มีความกว้างดอก 1.85, 1.85, 1.61, 1.57, 1.48, 1.37, 1.35 และ 0.95 เซนติเมตรต่อดอก ตามลำดับ และความยาวดอก พบว่าสูตรที่ 7 มีความยาวดอกมากที่สุด คือ 2.52 เซนติเมตรต่อดอก รองลงมาคือ สูตรที่ 9, 8, 4, 6, 3, 1, 2 และ 5 มีความยาวดอก 2.26, 2.25, 2.17, 2.12, 2.07, 2.02, 2.01 และ 1.70 เซนติเมตรต่อดอก ตามลำดับ

**ตารางที่ 4** การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) ผลผลิตเห็ดแครง (กรัมต่อก้อน) จำนวนดอกเห็ดแครง (ดอกต่อก้อน) ความยาวดอกเห็ดแครง (เซนติเมตรต่อดอก) และความกว้างดอกเห็ดแครง (เซนติเมตรต่อดอก) เมื่อเปรียบเทียบการใช้อัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว

สูตร	การเจริญของ เชื้อในก้อนเชื้อ เห็ดแครง (เซนติเมตร)	น้ำหนักผลผลิต (กรัมต่อก้อน)	จำนวนดอก (ดอกต่อก้อน)	ความกว้างดอก (เซนติเมตรต่อดอก)	ความยาวดอก (เซนติเมตรต่อดอก)
1	10.41 <sup>a</sup>	46.09 <sup>b</sup>	116.77 <sup>a</sup>	1.35 <sup>g</sup>	2.02 <sup>g</sup>
2	5.62 <sup>i</sup>	25.96 <sup>e</sup>	93.93 <sup>c</sup>	1.37 <sup>f</sup>	2.01 <sup>h</sup>
3	7.60 <sup>g</sup>	32.54 <sup>d</sup>	96.72 <sup>b</sup>	1.48 <sup>e</sup>	2.07 <sup>f</sup>
4	9.16 <sup>b</sup>	41.21 <sup>c</sup>	88.82 <sup>e</sup>	1.57 <sup>d</sup>	2.17 <sup>d</sup>
5	8.75 <sup>e</sup>	49.96 <sup>a</sup>	53.35 <sup>h</sup>	0.95 <sup>h</sup>	1.70 <sup>i</sup>
6	6.28 <sup>h</sup>	31.06 <sup>h</sup>	52.65 <sup>i</sup>	1.61 <sup>c</sup>	2.12 <sup>e</sup>
7	7.86 <sup>f</sup>	32.98 <sup>f</sup>	60.93 <sup>g</sup>	1.85 <sup>b</sup>	2.52 <sup>a</sup>
8	8.98 <sup>c</sup>	38.27 <sup>d</sup>	71.38 <sup>f</sup>	2.02 <sup>a</sup>	2.25 <sup>c</sup>
9	8.86 <sup>d</sup>	37.30 <sup>e</sup>	89.85 <sup>d</sup>	1.85 <sup>b</sup>	2.26 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากแถวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ต้นทุนการผลิตเห็ดแครง พบว่า อัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว สำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดแครง ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ 1) กากมะพร้าวแห้งที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด และ 2) กากมะพร้าวสด และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด พบว่า สูตรที่ 7 มีต้นทุนในการผลิตเห็ดแครงต่ำสุด คือ 1.31 บาทต่อก้อน รองลงมาคือ สูตรที่ 8, 9, 6, 2, 5, 4, 3 และ 1 มีต้นทุนในการผลิตเห็ดแครง คือ 1.35, 1.38, 1.42, 1.56, 1.88, 2.21, 2.53 และ 2.85 บาทต่อก้อน ตามลำดับ และมีรายรับสูตรที่ 5 มีรายได้สูงสุด คือ 9.99 บาทต่อก้อน รองลงมาคือ สูตรที่ 1, 4, 8, 9, 7, 3, 6 และ 2 มีมีรายรับ 9.22, 8.24, 7.65, 7.46, 6.60, 6.51, 6.21 และ 5.19 บาทต่อก้อน ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

**ตารางที่ 5** ต้นทุนการผลิตเห็ดแครง (บาทต่อก้อน) และรายรับ (บาทต่อก้อน) เมื่อเปรียบเทียบการใช้อัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว

สูตร	ต้นทุนการผลิต (บาทต่อก้อน)	รายรับ (บาทต่อก้อน)
1. รำข้าวละเอียด 100%	2.85	9.22
2. กากมะพร้าวอบแห้ง 100%	1.56	5.19
3. กากมะพร้าวอบแห้ง 75% + รำข้าวละเอียด 25%	2.53	6.51
4. กากมะพร้าวอบแห้ง 50% + รำข้าวละเอียด 50%	2.21	8.24
5. กากมะพร้าวอบแห้ง 25% + รำข้าวละเอียด 75%	1.88	9.99
6. กากมะพร้าวสด 100%	1.42	6.21
7. กากมะพร้าวสด 75% + รำข้าวละเอียด 25%	1.31	6.60
8. กากมะพร้าวสด 50% + รำข้าวละเอียด 50%	1.35	7.65
9. กากมะพร้าวสด 25% + รำข้าวละเอียด 75%	1.38	7.46

## สรุป

การพัฒนาสูตรเพาะเลี้ยงเห็ดแครงในถุงโดยการนำกากมะพร้าวสดเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวอบแห้งทดแทนรำข้าวละเอียด โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยมีอัตราส่วนของกากมะพร้าวสดและแห้งกับรำข้าวละเอียด มี 5 ระดับ ผลการศึกษาพบว่าในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า การเจริญของเส้นใยเห็ด เมื่อเลี้ยงบนวัสดุเพาะในสูตรที่ 1 ถึง 5 ในจานเพาะเชื้อ พบว่ามีการเจริญของโคไคโนที่แตกต่างกันและมีอัตราการเจริญของเส้นใยในวันที่ 3 5 และ 7 พบว่า ลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดสีขาวฟู และสามารถเจริญได้เต็มผิววัสดุเมื่อเทียบกับสูตรที่ 1 และความหนาแน่นของเส้นใยพบว่าในสูตรที่ 1, 4, 5, 8 และ 9 มีเส้นใยเจริญหนาแน่นมาก

การเจริญของเชื้อในก้อนเชื้อเห็ดแครง (เซนติเมตร) หลังใส่หัวเชื้อ พบว่า สูตรรำข้าวละเอียด 100 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญของเส้นใยในก้อนเชื้อเห็ดแครง เท่ากับ 10.41 เซนติเมตร ผลผลิตรวมทั้งหมด โดยชั่งน้ำหนักจำนวนดอกเห็ดของแต่ละบาดแผล พบว่า สูตรที่ 5 ให้ผลรวมทั้งหมดมากที่สุด คือ 49.96 กรัมต่อก้อน จำนวนดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรรำข้าวละเอียด 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนดอกเห็ดแครงมากที่สุด คือ 116.77 ดอกต่อก้อน ความกว้างดอกเห็ดแครง พบว่า สูตรสูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 50:50 มีความกว้างดอกมากที่สุด คือ 2.02 เซนติเมตรต่อดอก และความยาวดอก พบว่าสูตรสูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีความยาวดอกมากที่สุด คือ 2.52 เซนติเมตรต่อดอก

ต้นทุนการผลิตเห็ดแครง พบว่า อัตราส่วนการทดแทนรำข้าวละเอียดด้วยกากมะพร้าว สำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดแครง ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ 1) กากมะพร้าวแห้งที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) และอัตราส่วน



ของรำข้าวละเอียด และ 2) กากมะพร้าวสด และอัตราส่วนของรำข้าวละเอียด พบว่า สูตรกากมะพร้าวสด: รำข้าวละเอียดอัตราส่วน 25:75 มีต้นทุนในการผลิตเห็ดแครง คือ 1.88 บาทต่อก้อน และมีรายรับสูงสุดคือ 9.99 บาท/ก้อน

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ขอขอบคุณที่ให้ความสะดวกในการออกสำรวจและเก็บข้อมูล

### เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2556). เห็ดแครง. [Online]. Available: <http://www.ifarm.in.th>. [2558, สิงหาคม 10].
- กัมปนาท และสัมฤทธิ์. (2557). วัสดุทดแทนขี้เลื่อยไม้ยางพาราสำหรับการเพาะเห็ด. ตามทันเกษตร ช่อง 7. [Online]. Available: <http://sumritipol-farm>. [2558, กรกฎาคม 20].
- นันทนา มูลมาตย์ สุขชัย อุดชาชน และ กฤตพล สมมาตย์. (2553). การประเมินคุณค่าทางโภชนาการและค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ของรำละเอียดกากเมล็ดหนุ่นและกากมะพร้าวในโคเนื้อพื้นเมืองไทย. ภาควิชาสัตวศาสตร์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น.
- มนตรี หาผล. (2556). การเพาะเห็ดแครงในถุงพลาสติก. [Online]. Available: <http://www.banhed113.blogspot.com>. [2556, กรกฎาคม 23].
- รัฐพล ศรีประเสริฐ และ สยาม อรุณศรีมรกต. (2557) การเพาะเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เสริมด้วยใบหญ้าแฝกกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides*) ในวัสดุเพาะขี้เลื่อยไม้ยางพารา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 22(6): ฉบับพิเศษ, 837-847.
- อานนท์ เอื้อตระกูล. (2551). เห็ด 3 อย่าง. [Online]. Available: <http://mushroom.co.th>. [2555, กันยายน 1].
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M., 1996. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons.

ภาพภาคผนวกที่ 10 การนำเสนอผลงานในระดับนานาชาติโครงการวิจัยย่อยที่ 3



1                   **Crude Glucan from By-Product Mushroom Cultivation Pulp of**  
2    ***Schizophyllum commune* Enhanced Innate Immunity and Resistance in Nile**  
3                   **tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Aeromonas veronii***

4                   Nion Chirapongsatonkul, Natnicha Mueangkan, Suppanut Wattitam and  
5                   Kittichon U-taynapun\*

6    Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si  
7                   Thammarat 80110, Thailand

8  
9    \* Corresponding author. Kittichon U-taynapun. Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Rajamangala  
10   University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat 80110, Thailand. Tel.: +66 815990778.  
11   E-mail addresses: e\_aquatic1@hotmail.com, kittichon.u@rmutsv.ac.th (K. U-taynapun).

12  
13   **Abstract**

14           The present study aimed to investigate the immunostimulatory efficacy of crude  
15   glucan extracted from the by-product of split gill mushroom, *Schizophyllum commune*,  
16   cultivation pulps (Cr-glucan) on modulation of the innate immune responses in Nile tilapia  
17   (*Oreochromis niloticus*). Cr-glucan obtained by pressurized hot water extraction comprised  
18   mainly  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-glucan and residues of  $\alpha$ -glucan, protein, phenolic compounds, and  
19   lipid. The immunostimulatory effect of the Cr-glucan was determined compared with that of  
20   commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* glucan (Yb-glucan) by intraperitoneally  
21   (i.p.) injection into fish. Innate immunity including cellular immune parameters in blood,  
22   blood cell count and differential leukocytes, and humoral immune parameters in blood, total  
23   immunoglobulin, bactericidal activity, peroxidase, lysozyme, and anti-protease as well as  
24   skin mucosal peroxidase and lysozyme was examined. The results showed that Cr-glucan  
25   could induce these immune parameters as similar as did Yb-glucan which significantly higher  
26   ( $P < 0.05$ ) than those in the control fish. The transcriptional level of the immunity regarding



27 immune transducers and pro-inflammatory cytokines was also determined. Both glucans up-  
28 regulated all tested immune genes. The different immune stimulation manner was observed;  
29 Yb-glucan induced the expression of immune genes in the shorter time period while Cr-  
30 glucan could extend this action. In addition, the disease resistance against a pathogenic  
31 bacteria *Aeromonas veronii*, a causing agent of motile aeromonas septicemia (MAS), was  
32 established. The survival proportion in Cr-glucan treatment was apparently higher than that  
33 of Yb-glucan and PBS, respectively. The results together suggested that Cr-glucan enhanced  
34 innate immunity contributing to the protective immunity in Nile tilapia against *A. veronii*.  
35 These findings provide the first evidence promoting the efficacy of crude glucan from  
36 valueless by-product in aquatic animal which can be used as a potent immunostimulant.

37

38 **Keywords:** *Aeromonas veronii*, By-product mushroom cultivation pulp, Innate immunity,  
39 Glucan, *Oreochromis niloticus*, *Schizophyllum commune*

40

#### 41 **1. Introduction**

42 Aquaculture has been grown very fast since it is considerably contributed to produce  
43 quality diets for human. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is marked as one of the top  
44 cultured fish worldwide because of its favorable characteristics, for example, rapid growth  
45 and adequate stress tolerance and disease resistance [1,2]. However, one of the serious  
46 problems in aquaculture and fish farming nowadays is diseases which occur in a gathering of  
47 appropriate conditions of host, pathogen and environment. There have been reported that  
48 climate change and intensive culture system, which causes lack of good fish health  
49 management, enhance several factors including bacterial infection, ectoparasite infestation  
50 and stress environmental conditions leading to the increase of susceptibility to fish diseases  
51 [3–5]. Many strategies have focused on disease management regarding good farm

52 management, control the pathogens using chemotherapeutics, antibiotics and naturally  
53 antimicrobial agents and enhancing the host immunity through non-specific or innate defense  
54 mechanisms to increase resistance [6–8]. In the latest regard, several approaches including  
55 immunostimulants application has been highlighted for decades since chemicals and  
56 antibiotics have led to the residual problems which has negatively effects on human being  
57 and environment [9–11].

58 One of the promise immunostimulants applied in aquaculture are molecules classified  
59 as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) which are not synthesized by the host.  
60 These includes bacterial, fungal, parasitic, and viral components, for example,  
61 lipopolysaccharide (LPS),  $\beta$ -glucan, double stranded RNA, and DNA fragment with specific  
62 motifs and unmethylated cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)  
63 [12]. Among PAMPs,  $\beta$ -glucan have been of great interest because of its potent and  
64 promising efficiency to improve immunity of various host animals [3]. Recently, the effect of  
65  $\beta$ -glucan as the immunostimulator has been demonstrated in several fish species such as sea  
66 bass [13,14], Atlantic salmon [15], rainbow trout [16–18], catfish [19], and tilapia [20,21].

67  $\beta$ -glucan, a homopolysaccharide of glucose molecule linked by the glycosidic bond, is  
68 found as major constituents of cell wall of some plants, bacteria, yeast, fungi, mushroom, and  
69 algae [22]. The common structure of  $\beta$ -glucans consists of a backbone of  $\beta$ -(1→3)-linked  $\beta$ -D  
70 -glucopyranosyl units with  $\beta$ -(1→6)-linked side chains of varying distribution and length  
71 depending on their sources.  $\beta$ -glucans derived from different sources and isolation processes  
72 have structurally differences which may confer different immunostimulatory potentials  
73 [3,7,20].  $\beta$ -glucan in forms of  $\beta$ -1→3 and 1→6 glucan which derived from the cell wall of  
74 baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* has been the most common  $\beta$ -glucan currently used  
75 in aquaculture. However, edible mushrooms are a promising source of  $\beta$ -glucan since it has  
76 been typically used as food and medicine. However, only a few researches using mushroom

77  $\beta$ -glucan in aquaculture have been published [23–25]. The well-known mushroom  $\beta$ -glucans  
78 derived from the split gill mushroom or *Schizophyllum commune* has been demonstrated for  
79 its immunosimulatory efficacy on aquatic animals including black tiger shrimp [26,27] and  
80 white shrimp [28].

81 In southern part of Thailand where the weather is hot with high humidity, mushroom  
82 cultivation is one of the popular occupations. Split gill mushroom is a local mushroom that is  
83 widely cultured throughout this area. *S. commune* is a member of white-rot basidiomycetes  
84 which is considered as a wood-decay fungus or plant parasite since it causes wood rot  
85 through its produced lignocellulolytic enzymes [29,30]. After harvesting, a large number of  
86 by-product mushroom cultivation pulp containing crowded mycelia thus left for being  
87 managed. The farmers typically drop the cultivation pulps at trunk of the trees which may  
88 cause consequently harmful. To solve this problem by means of sustainable and  
89 environmental friendly procedure together with increasing value of the by-product, we  
90 therefore deliberate about a potential of glucan, a component of its mycelia, as the  
91 immunostimulant. First and foremost, the efficiency of this low-cost glucan from by-product  
92 cultivation pulps has to be ascertained. Therefore, this research focused on comparative  
93 analysis of the immunomodulatory activity of the extracted crude glucan from by-product  
94 cultivation pulps and the commercial  $\beta$ -glucan from yeast *S. cerevisiae*. We began with the  
95 characterization; yield and the components of the obtained crude glucan. To investigate the  
96 immunostimulatory efficacy, systemic innate immune parameters including blood cellular  
97 and humoral responses, responsive proteins in mucus and the expression of genes involved in  
98 defense response were measured. The induced resistance in Nile tilapia against *Aeromonas*  
99 *veronii*, a pathogenic bacterium isolated from diseased fish expressing motile aeromonas  
100 septicemia (MAS), was also studied. To the best of our knowledge, this present work is the  
101 first report demonstrating the immunostimulatory potential of  $\beta$ -glucan derived from



102 mushroom by-product which might be applied as the low-cost immunostimulant reducing  
103 the cost in aquaculture industry.

104

## 105 **2. Materials and Methods**

### 106 *2.1. Crude glucan preparation*

107 Split gill mushroom by-product cultivation pulps (Fig. S1 in the supplementary  
108 material) especially that contained dense mycelia, were roughly ground into small particles,  
109 washed with tap water and dried overnight at 55°C before using for extraction. Crude glucan  
110 was acquired following pressurized hot water extraction procedure adapted from Khatua and  
111 Acharya [31]. The water was added to the dried by-product with a ratio of 1:15 then  
112 autoclaved at 121°C for 30 min. The extracted product was centrifuged (8,000 × g for 10 min  
113 at 15°C) then the supernatant was collected and pH adjustment using 1 M NaOH to pH  
114 7.0±0.1. An equal volume of 95% (v/v) ethanol was added to each supernatant and then kept  
115 overnight at -20°C to precipitate the polysaccharide. The precipitated crude glucans were  
116 isolated by centrifugation (8,000 × g for 10 min at 4°C), dried and kept at -20°C for further  
117 analyses.

118 The yield of extracted glucan was expressed as gram of crude glucan per 100 g of  
119 dried by-product cultivation pulps used at the beginning of the extraction process.

120

### 121 *2.2. Characterization of crude glucan*

122 For characterization, the obtained crude glucan (100 mg) was dissolved in 10 mL of  
123 sterile distilled water. During the dissolution, the prepared crude glucan was warmed on the  
124 hot plate stirrer to enhance the solubility. After centrifugation (8,000 × g for 5 min at 4°C),  
125 the soluble form, named Cr-glucan, was used for further analysis.

126 All component values were expressed as gram of standard equivalents per 100 g of  
127 crude dry glucan.

#### 128 2.2.1. Total carbohydrate

129 Total carbohydrate was measured by phenol sulphuric acid method following Dubois  
130 et al. [32] with moderate modification using glucose as standard. An absorbance was read at  
131 490 nm in a microplate absorbance reader, EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrome,  
132 UK).

#### 133 2.2.2. Total protein

134 The amount of protein in the obtained crude glucan was determined by Lowry method  
135 [33] with slight modification using BSA as standard. The absorbance at 640 nm was read in  
136 the microplate absorbance reader, EZ Read 2000 Microplate Reader (Biochrome, UK).

#### 137 2.2.3. Glucan composition

138 The content of total glucan,  $\alpha$ -glucan and  $\beta$ -glucan of the crude extracts was  
139 determined following the manufacturer's instruction in the protocols of mushroom and  $\beta$ -  
140 glucan assay kit (Megazyme Int, Ireland).

#### 141 2.2.4. Total phenolic compounds

142 Total phenolic content in the crude polysaccharide was measured using Folin-  
143 Ciocalteu reagent following Gutfinger [34] and Ziestin and Ben-Zaker [35] with moderate  
144 adaptation. The absorbance was measured at 750 nm using EZ Read 2000 Microplate Reader  
145 (Biochrome, UK).

#### 146 2.2.5. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR)

147 The FTIR was performed to gain the FTIR spectra and functional groups of the crude  
148 glucan. The FTIR spectra were recorded on a Cary 630 attenuated total reflectance mid-  
149 infrared spectrometers (Agilent Technologies, USA) in a frequency range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ .

150

151 2.3. *Fish management*

152 The experimental procedures performed with aquatic animals were in accordance with  
153 institutional guidelines for the use of animals and the Ethical Principles and Guidelines for  
154 the Use of Animals for Scientific Purposes (Ethical Principles) [36] for the care and use of  
155 animals for scientific purpose. The protocol was approved by the Animal Ethics Committee,  
156 Rajamangala University of Technology Srivijaya (RMUTSV) (Ethics ID IAC 01-02-60). Nile  
157 tilapia fingerlings at  $5\pm 1$  g were obtained from a commercial supplier in Songkhla Province.  
158 All fish were maintained in freshwater (DO > 6.0 ppm, pH 6–7.5 and temperature at  $29\pm 2^\circ\text{C}$ )  
159 within an environmentally controlled aquarium room and fed with the commercial fish pellet  
160 (Thaiunion Feedmill, Thailand) 3 times a day until the fish reached a mean weight of  $70\pm 5$  g  
161 (approximately 2 months). Thereafter, fish were sampled from the holding tank and relocated  
162 into 18 experimental tanks for 3 treatments described in 2.4. All fish were acclimated for 2  
163 weeks prior to being used in the experiments.

164

165 2.4. *Experimental design: the effects of glucans on innate immunological parameters and*  
166 *resistance against bacterial pathogen*

167 The experiments were performed based on completely randomized design (CRD)  
168 comprising 3 treatments which were challenged with 2 different glucans, commercial  $\beta$ -  
169 glucan from baker's yeast *S. cerevisiae* (purity  $\geq 98\%$ , Sigma, US) named as Yb-glucan and  
170 Cr-glucan, and control (PBS). Each glucan was subjected into the fish with an amount of 10  
171  $\mu\text{g}/\text{fish}$ . Each treatment comprised 6 tanks which were divided into 2 groups; 3 tanks for  
172 measurement of immune parameters and the rest 3 tanks for challenging with *A. veronii*.

173 Twelve fish per group were acclimated for 2 weeks in a 200 L-plastic aquarium tank  
174 containing 150 L of water. After acclimation, the fish were anesthetized with clove oil prior  
175 to being challenged with each tested glucan or PBS by intraperitoneal (i.p.) injection.



176 *2.5. Fish sampling and analysis procedure*

177 At 6, 12 and 24 h after injection (hpi), 2 fish were randomly picked from each tank.

178 The fish were anaesthetized in water containing clove oil at the concentration of 100 mg/L  
179 until ventilator movements ceased [20].

180 Blood (approximately 1.5 mL) were drawn from the caudal vessels using a cooled 27-  
181 gauge needle and 1mL syringe with and without anticoagulant for plasma/haematological  
182 determination [37] and sera, respectively, and then transferred into a 1.5mL centrifuge tube  
183 placed on ice. For plasma, the collected blood samples were centrifuged ( $8,000 \times g$  for  
184 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ) then the supernatant were collected, aliquated to a small volume, to avoid any  
185 effects caused by freeze-thaw, and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analyses of total  
186 immunoglobulin (Ig), and bactericidal activity. For serum, the blood clotting was introduced  
187 by placing the collecting tube at room temperature for 2 h then at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. The serum  
188 was separated by centrifugation ( $8,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ). The clear serum was aliquated  
189 and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for serum immunological analyses including anti-protease, peroxidase  
190 and lysozyme activities.

191 Skin mucus was collected followed the method of Guardiola et al. [38] with some  
192 modifications. Anaesthetized fish was surface washed by running tap and the excess water  
193 was absorbed, skin mucus was collected by gently scraping the dorso-lateral surface using a  
194 plastic spatula. Contamination of blood and/or urino-genital and intestinal excretions should  
195 be careful. Collected mucus was homogenized with 1 volume of sterile PBS, vigorously  
196 mixed and centrifuged at  $8,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was aliquated and  
197 stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for lysozyme and peroxidase analysis.

198 Head kidney (HK) were collected from all picked fish after anaesthetized with clove  
199 oil, and then kept in RNAlater<sup>®</sup> (Invitrogen) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used for total RNA  
200 isolation.

201 2.6. Hematological analysis and innate immune parameters

202 2.6.1. Hematological assay

203 Hematological parameters including number of hematocrit (HCT), red blood cell  
204 (RBC), white blood cell (WBC), platelet count (PLT), and hemoglobin (HGB) were  
205 measured using an automated hematology analyzer (BC-2800vet, Shenzhen, Mindray Bio-  
206 Medical Electronics, China) in accordance with Xu et al. [37].

207 Blood smear, observation of a subpopulation of each differentiation blood cell types,  
208 was performed by Giemsa staining and examination under a light microscope and  
209 photomicroscope according to Esteban et al. [39] with some modifications.

210 2.6.2. Total Ig

211 The amount of plasma Ig was determined following the modified method described  
212 by Khosravi et al. [40]. Lowry's method (previously described in 2.2.2) was conducted to  
213 measure the protein contents in plasma prior and after precipitating down the Ig molecules  
214 using 12% (w/v) PEG 6000 solution. The Ig content was presented through the difference in  
215 protein contents.

216 2.6.3. Bactericidal activity

217 The plasma bactericidal activity was assayed following Vasudeva Rao et al. [41] and  
218 Aly et al. [42] with mild adaptation. Plasma, at a suitable dilution, was incubated with an  
219 equal volume of *A. veronii* suspension ( $10^7$  CFU/mL) for 1 h at 37°C while PBS was used  
220 instead of the plasma as the control. After incubation, the number of viable bacteria was  
221 determined by counting the colonies grown on Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, Germany)  
222 plate in duplicate. %Bactericidal activity was calculated based on the number of viable  
223 bacteria in the plasma and control treatments.

224

225

226 2.6.4. Peroxidase

227 The total peroxidase activity in serum was measured according to a minor  
228 modification of Lazado et al. [43]. The reaction mixture contained fish serum in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$   
229 Free-Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), 20 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine  
230 hydrochloride (TMB, Sigma, CA) and 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma, CA). The reaction was incubated  
231 in the dark for color-developing for 2 min then 4 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added to stop the reaction. An  
232 optical density (OD) was read at 450 nm in the microplate absorbance reader, EZ Read 2000  
233 Microplate Reader (Biochrome, UK). The reaction mixer without serum was used as blank.  
234 All the serum samples were analyzed in triplicate.

235 2.6.5. Lysozyme activity

236 Serum lysozyme activity was determined following the method of U-taynapun et al.  
237 [12]. Fish serum was incubated with 0.03% (w/w) lyophilized *Micrococcus lysodeikticus*  
238 (Sigma, US) in 0.05 mM sodium phosphate buffer (pH 6.2) at 22°C for turbidimetric assay.  
239 After incubation for 30 S and 4.5 min, the absorbance at 490 nm was read using EZ Read  
240 2000 Microplate Reader (Biochrome, UK). All serum samples were analyzed in triplicate.  
241 One unit of lysozyme activity referred to a reduction in absorbance of 0.001 per min.

242 2.6.6. Anti-protease activity

243 Anti-protease activity in serum was analyzed an ability of serum to inhibit trypsin  
244 activity according to Christyapita et al. [44] with some modifications. Fish serum was pre-  
245 incubated with standard trypsin solution (trypsin porcine pancreas in 0.1 M Tri-HCl pH 8.2,  
246 Sigma, US) for 10 min at room temperature then the substrate 2 mM sodium-benzoyl-DL-  
247 arginine-*p*-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, Sigma, US) was added. After incubation at  
248 20°C for 25 min, 30% (v/v) trichloroacetic acid (TCA, Sigma, US) was added to stop  
249 reaction. The absorbance was recorded at 415 nm using EZ Read 2000 Microplate Reader  
250 (Biochrome, UK). For positive and negative control, buffer was used instead of the serum



251 while buffer was replaced instead both of serum and trypsin solution, respectively. The  
252 percentage of inhibitory capacity of anti-proteases against trypsin was calculated through  
253 relative comparison the remaining trypsin activities in the serum treatment with that in the  
254 positive control. All serum samples were analyzed in triplicate.

255

## 256 *2.7. Expression of the immune-related genes*

### 257 *2.7.1. RNA extraction and cDNA synthesis*

258 Total RNA was isolated from the fish HK tissue using the Total RNA Mini Kit  
259 (Tissue) (Geneaid, Taiwan) following the manufacturer's instruction with slight modification.  
260 Thirty mg of the HK from each treatment and time-point was homogenized in 500  $\mu$ L of  
261 Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, USA) prior to continuing with the protocol the kit's instruction.  
262 The extracted RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) to remove the  
263 contaminated DNA. The yield and purity of the extracted RNA was determined  
264 spectrophotometrically using a BioDrop DUO UV Vis spectrophotometer (BioDrop, UK)  
265 while integrity of RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis.

266 The first strand cDNA was synthesized using 1  $\mu$ g of total RNA in a High-Capacity  
267 cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the  
268 manufacturing instruction. The reverse-transcription reaction was performed in T100<sup>™</sup>  
269 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). The reaction product of each sample was diluted in  
270 DNase/RNase-free water (Promega, US) and stored at  $-20^{\circ}$ C until used.

### 271 *2.7.2. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis*

272 The cDNA from HK were analyzed through qPCR technique for the expression of 5  
273 immune-related genes including Toll-like receptor 2 (TLR2), Janus kinase 1 (JAK1),  
274 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrotic factor-1 $\alpha$  (TNF-1 $\alpha$ ), and nuclear factor-kB (NF-kB)  
275 using  $\beta$ -actin as a reference gene. The detail of primers of the target genes are shown in Table

251 while buffer was replaced instead both of serum and trypsin solution, respectively. The  
252 percentage of inhibitory capacity of anti-proteases against trypsin was calculated through  
253 relative comparison the remaining trypsin activities in the serum treatment with that in the  
254 positive control. All serum samples were analyzed in triplicate.

255

## 256 2.7. Expression of the immune-related genes

### 257 2.7.1. RNA extraction and cDNA synthesis

258 Total RNA was isolated from the fish HK tissue using the Total RNA Mini Kit  
259 (Tissue) (Geneaid, Taiwan) following the manufacturer's instruction with slight modification.  
260 Thirty mg of the HK from each treatment and time-point was homogenized in 500  $\mu$ L of  
261 Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, USA) prior to continuing with the protocol the kit's instruction.  
262 The extracted RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) to remove the  
263 contaminated DNA. The yield and purity of the extracted RNA was determined  
264 spectrophotometrically using a BioDrop DUO UV Vis spectrophotometer (BioDrop, UK)  
265 while integrity of RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis.

266 The first strand cDNA was synthesized using 1  $\mu$ g of total RNA in a High-Capacity  
267 cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the  
268 manufacturing instruction. The reverse-transcription reaction was performed in T100<sup>™</sup>  
269 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). The reaction product of each sample was diluted in  
270 DNase/RNase-free water (Promega, US) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

### 271 2.7.2. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis

272 The cDNA from HK were analyzed through qPCR technique for the expression of 5  
273 immune-related genes including Toll-like receptor 2 (TLR2), Janus kinase 1 (JAK1),  
274 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrotic factor-1 $\alpha$  (TNF-1 $\alpha$ ), and nuclear factor-kB (NF-kB)  
275 using  $\beta$ -actin as a reference gene. The detail of primers of the target genes are shown in Table

276 1. Each qPCR reaction mixture (total 20  $\mu$ L) contained cDNA, Luna<sup>®</sup> Universal qPCR  
277 Master Mix (New England BioLabs, Canada) and primer cocktail (final concentration of 250  
278 nM each) and adjusted the desired final volume with DEPC-treated water. The reactions were  
279 performed in triplicate in a 96-well plate and operated in CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR  
280 (Bio-Rad, USA). Cycling conditions, adopted following the instruction of Luna<sup>®</sup> Universal  
281 qPCR Master Mix, were as follows: 95°C for 1 min followed by 40 cycles of 15 S at 95°C  
282 and 30 S at 55–65°C (depended on primer pairs). Melting curves were also analyzed for all  
283 amplification products. The fold change of relative expression of all target genes in HK was  
284 calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [45] with  $\beta$ -actin as the internal reference.

285

#### 286 2.8. The disease resistance in fish against *A. veronii*

287 The induction of disease resistance in glucan-treated fish compared with the control  
288 was conducted by bacterial challenge test in triplicate. *A. veronii*, isolated from MAS-  
289 infected tilapia and kept in our laboratory, was used as the test pathogen in this study. Each  
290 fish was i.p. injected with 0.1 mL sterile PBS, PBS containing 5  $\mu$ g of Yb-glucan or Cr-  
291 glucan and kept in 200L-plastic aquarium tanks containing 150 L of water (12 fish per tank)  
292 and cultured under laboratory fish culture conditions as mentioned above. Six h after glucan  
293 treatment, fish were challenged by i.p. injection with 0.1 mL of suspension of *A. veronii*  
294 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL), resulting in  $1 \times 10^7$  CFU/fish. The positive and negative control fish was  
295 injected with PBS (without glucan) and non *A. veronii*, respectively. The cumulative  
296 mortality was recorded for 10 days. %Mortality was calculated from the average data  
297 obtained from triplicate tanks.

298 To verify whether fish died because of the *A. veronii* challenging, the brain of fresh  
299 dead fish were randomly collected and extracted through aseptic techniques. Bacteria in the  
300 brain extracts were cultured on TSA and incubated at 35°C for 24 h. The grown bacteria were



301 further phenotypic characterized by Gram stain and biochemical test based on API 20E  
 302 system (BioMérieux<sup>®</sup>, France).

303

304 **Table 1** Primers used for analysis of immune-related gene expression in this study

Target gene	Primer name	Primer sequencing	GenBank Accession no.
TLR2	qTLR2_F	5' GCAGACACAGAAGCCCTGAT 3'	JQ 809459.1
	qTLR2_R	5' CCAGGAAGGAAATCCCGCTT 3'	
JAK1	qJAK1_F	5' GAGGGAACACCGTACTGGA 3'	XM_003452341
	qJAK1_R	5' AGGCATTTTCTCGTTCATGG 3'	
IL-1 $\beta$	qIL-1 $\beta$ _F	5' AAGGATGACGACAAGCCAAC 3'	KF747686.1
	qIL-1 $\beta$ _R	5' CGCTGTGCTGATGTACCACT 3'	
TNF-1 $\alpha$	qTNF1 $\alpha$ _F	5' GAGGCCAATAAAAATCATCATCCC 3'	NM_001279533
	qTNF1 $\alpha$ _R	5' CTTCCCATAGACTCTGAGTAGCG 3'	
NF-kB	qNF-kB_F	5' GCAGTCACAACCACAGCAAT 3'	XM_025910842.1
	qNF-kB_R	5' TCCCCAAACTTCAGGACAAC 3'	
$\beta$ -actin	q $\beta$ -actin_F	5' GTGCCCATCTACGAGGGTTA 3'	XM_003443127
	q $\beta$ -actin_R	5' CTCCTTAATGTCACGCACGA 3'	

305

306 *2.9. Statistical analysis*

307 The data were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) via the SPSS  
 308 Statistics software version 16.0 (SPSS Inc., US). The significant differences of the innate  
 309 immune parameters and immune-related gene expressions among treatments were analyzed

310 using a multiple comparison Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Significant differences  
311 were stated at  $P < 0.05$ .

312

### 313 3. Results

#### 314 3.1. Characterization of the crude glucan extracted from split gill mushroom by-product 315 cultivation pulps

316 The components of the Cr-glucan which was prepared by autoclaving for 30 min with  
317 the ratio of dried mushroom by-product cultivation pulps and water at 1:15 are shown in  
318 Table 2. Carbohydrate was the main component detected in Cr-glucan followed by protein  
319 while phenolic compound was remarkably low. Interestingly, carbohydrate content in the  
320 extract was characterized as glucan and most of glucan, approximately 97%, was present in  
321  $\beta$ -form.

322 **Table 2** Characterization of crude glucan obtained from split gill mushroom by-product  
323 cultivation pulps

Components	Crude glucan
Yield (g/100g dry weight)	3.17±0.32
Total carbohydrate (g/100 g crude glucan)	28.84±2.18
Total protein (g/100 g crude glucan)	8.68±0.85
Total phenolic compound (g/100 g crude glucan)	1.29±0.13
Total glucan (g/100 g crude glucan)	27.15±1.38
$\beta$ -glucan (g/100 g crude glucan)	26.67±1.45
$\alpha$ -glucan (g/100 g crude glucan)	0.48±0.06

324

325 The structure of polysaccharide such as glycosidic bonds and functional groups of the  
326 Cr-glucan were analyzed compared to the commercial  $\beta$ -glucan from yeast (Yb-glucan)

327 through FTIR. The similar FTIR spectra showing the typical carbohydrate pattern were  
328 observed in both tested glucans (Fig. 1). The bands near 3390, 1645, 1372, and 1254  $\text{cm}^{-1}$   
329 represent a profile of saccharide and the absorption peaks between 1250 and 950  $\text{cm}^{-1}$   
330 indicate that the sugar rings were pyranose rings. Mild band at 2922  $\text{cm}^{-1}$  indicate  $\text{CH}_2$   
331 stretching. Absorption peaks visible near 1160, 1078, 1044 and 890 (weak band)  $\text{cm}^{-1}$  are  
332 characteristics of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6) glucan [46–48]. According to the aforementioned results, it  
333 can be concluded that the obtained Cr-glucan were composed of  $\beta$ -glucan. However, the  
334 FTIR spectrum of Cr-glucan showed the peak of amide (around 1631  $\text{cm}^{-1}$ ), a band  
335 corresponds to OH group of phenolic compound (1410  $\text{cm}^{-1}$ ), R–CH group (the bands  
336 between 500 and 749  $\text{cm}^{-1}$ ), and C=O bond (Stake-shape band at 1710  $\text{cm}^{-1}$ ) [31,46–48] while  
337 these mentioned bands were not observed in the Yb-glucan. These results indicated that Cr-  
338 glucan contained some of protein, lipid, phenolic compounds, and uronic acid comparable to  
339 the characterization data present in Table 2.



341 **Fig. 1.** FTIR spectra of yeast glucan (Yb-glucan) and the obtained crude glucan from by-  
342 product *S. commune* cultivation pulp (Cr-glucan)



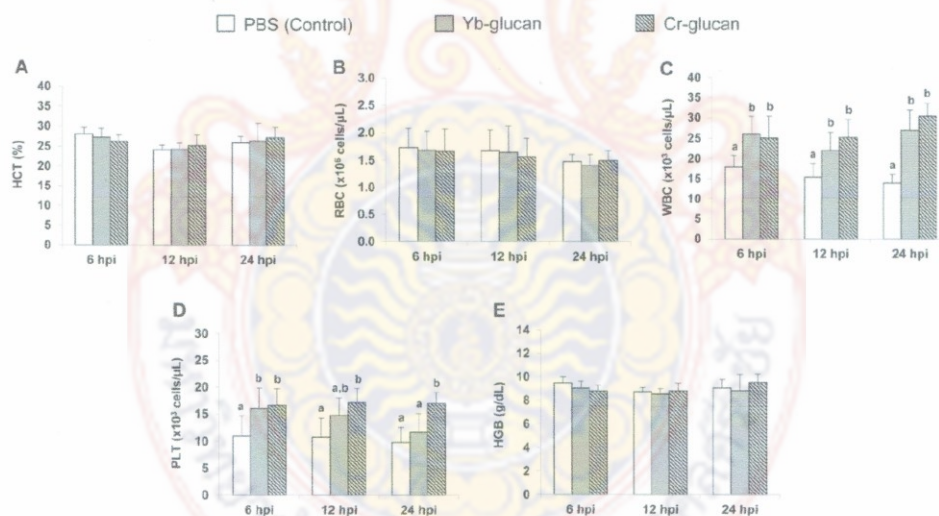
343 3.2 Effects of Cr-glucan on hematological and blood immune function parameters

344 The potential of the Cr-glucan from split gill mushroom by-product cultivation pulps  
 345 as the immunostimulant was discovered compared with that of the effective immunostimulant  
 346 Yb-glucan. Non-specific immune parameters including cellular and humoral parameters were  
 347 examined.

348 3.2.1 Cellular innate immune parameters Table 3

349 Hematological parameters including HCT, RBC, WBC, PLT, and HGB (Fig. 2) and  
 350 differential leukocyte count (Fig. 3 and Fig. 4) were determined in the fish treated with Yb-  
 351 glucan and Cr-glucan compared with the control fish injected with PBS.

352 Both Yb-glucan and Cr-glucan could elicit the change of hematological parameters in  
 353 the similar pattern. Significantly higher WBC ( $P < 0.05$ ) and PLT ( $P < 0.05$ ) were observed in  
 354 the fish injected with all tested glucans compared with those in the control (Fig. 2).



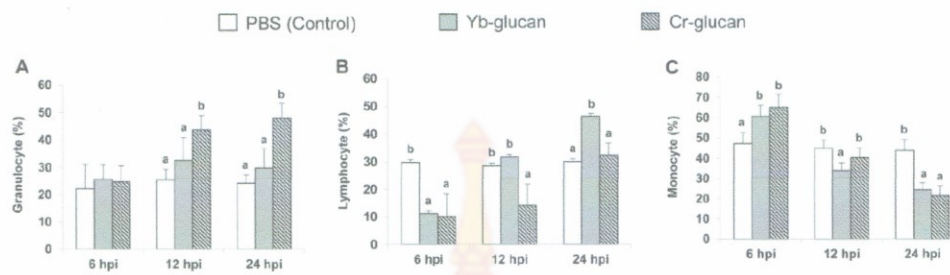
355  
 356 **Fig. 2.** Hematological parameters determined in fish blood at 6, 12 and 24 hour post injection  
 357 (hpi) with Cr-glucan, Yb-glucan and PBS (control). (A) HCT: Hematocrit, (B) RBC: Red  
 358 blood cell, (C) WBC: White blood cell, (D) PLT: Platelet count, and (E) HGB: Hemoglobin.

359 The results were expressed as mean±SD (n=6). Different letters stand for statistically  
360 significant differences ( $P<0.05$ ) between groups.

361

362 Since the leukocyte has been clearly demonstrated involving in protecting the host  
363 through non-specific immune response, the differential leukocyte or WBC count was  
364 therefore determined. Three types of leukocyte were distinguished by blood smear. The  
365 significantly higher number of granulocytes ( $P<0.05$ ) was observed in the Yb-glucan and Cr-  
366 glucan injected fish at 6 and 12 hpi (Fig. 3A). At 6 hpi, the number in lymphocyte in the  
367 control was statistically higher than the glucan injected groups. However, Yb-glucan showed  
368 the significant greater number of lymphocytes at 12 and 24 hpi compared to that of Cr-glucan  
369 (Fig. 3B). The different induction pattern of monocytes was detected in the fish treated with  
370 glucans (Fig. 3C). Both tested glucans caused the significantly higher monocyte percentage  
371 ( $P<0.05$ ) at 6 hpi whereas it was remarkably decreased to lower level in the Yb-glucan  
372 treatment ( $P<0.05$ ) than that of control group at 12 and 24 hpi. A slight drop of monocyte  
373 amount was also observed in the fish injected with Cr-glucan but it was significantly lower  
374 ( $P<0.05$ ) than that of the control only at 24 hpi.

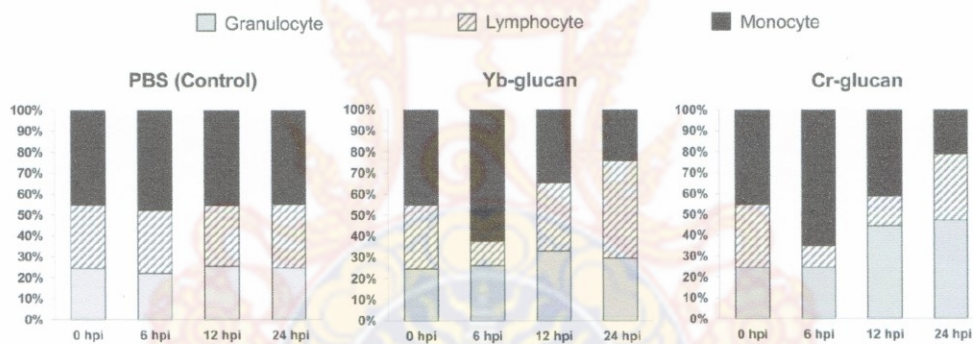
375 The time course proportion of each type of the leukocyte is present in Fig. 4. The  
376 result revealed that the leukocyte component was slightly changed in the control fish while its  
377 component was altered after Yb-glucan and Cr-glucan injection. In the glucan treatments,  
378 percentages of lymphocyte and monocyte were fluctuated meanwhile, however, the slight  
379 differences was observed especially at 12 and 24 hpi. The elevated level of granulocytes was  
380 revealed in Cr-glucan treated fish at 12 and 24 hpi.



381

382 **Fig. 3.** Differentiate leukocyte determined in fish i.p. injection with Cr-glucan, Yb-glucan  
 383 and PBS (control) at 6, 12 and 24 hour post injection (hpi). The results were expressed as  
 384 mean $\pm$ SD (n=6). Different letters stand for statistically significant differences ( $P < 0.05$ )  
 385 between groups.

386



387

388 **Fig. 4.** The course of differential leukocyte counts and their proportion in fish i.p. injection  
 389 with Cr-glucan, Yb-glucan and PBS (control).

390

391 3.2.2 Humoral innate immune parameters

392 3.2.2.1 Total Ig

393 Comparison with the control group, total Ig level in the fish injected with Cr-glucan  
 394 was significantly greater ( $P < 0.05$ ) throughout the tested period while the significant  
 395 difference in Yb-glucan treatment was detected at 12 and 24 hpi. However, a resemble Ig



396 amount ( $P>0.05$ ) induced by Yb-glucan and Cr-glucan was noticed at 6 and 12 hpi. At 24  
397 hpi, Cr-glucan showed significantly higher level ( $P<0.05$ ) than that of Yb-glucan (Fig. 5A).

#### 398 3.2.2.2 Bactericidal activity

399 Bactericidal activity to eradicate the attacking pathogen *A. veronii* *in vitro* was  
400 determined in order to investigate the immune enhancement potential of the tested glucans.  
401 Throughout the experiment, both glucans significantly triggered the induction of plasma  
402 bactericidal activity ( $P<0.05$ ) compared to the control, however, the activity in fish treated  
403 with Cr-glucan was detected significantly higher than that of Yb-glucan at 24 hpi ( $P>0.05$ )  
404 (Fig. 5B) compatible to the total Ig shown in Fig. 5A.

#### 405 3.2.2.3 Peroxidase

406 The result of the peroxidase activity in the fish sera is present in Fig. 5C. The  
407 significant induction level was detected only in the fish injected with Cr-glucan ( $P<0.05$ ) at 6  
408 and 12 hpi compared with those of control fish. However, the peroxidase activity was not  
409 significant ( $P>0.05$ ) between Yb-glucan treated fish and control group in all detection times.  
410 The activity in the glucan treated groups turned to the similar level as those of the control in  
411 later time-points (24 hpi). These data exhibited the quite temporary stimulatory effect of  
412 glucans on peroxidase.

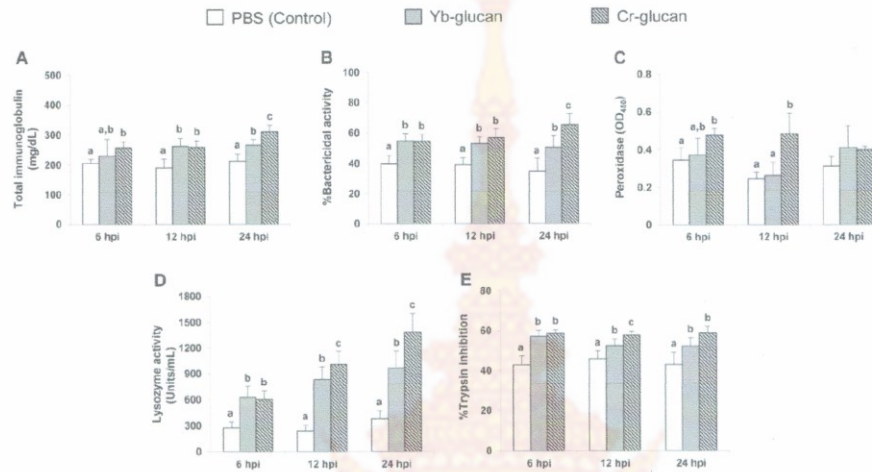
#### 413 3.2.2.4 Lysozyme activity

414 Comparison with the control, stimulation with both glucans resulted in the significant  
415 increase ( $P<0.05$ ) of serum lysozyme activity at all tested time-points. In addition, Cr-glucan  
416 triggered statistically greater activity at 12 and 24 hpi than did Yb-glucan ( $P<0.05$ ) (Fig. 5D).

#### 417 3.2.2.5 Anti-protease activity (Trypsin inhibition)

418 The induction pattern of serum anti-protease activity expressed in fish treated with  
419 Yb-glucan and Cr-glucan (Fig. 5E) was similar with those of other blood humoral innate  
420 immune parameters except that of peroxidase shown in Fig. 5C. Sera in the fish treated with

421 Yb-glucan and Cr-glucan exhibited the significantly higher of trypsin inhibitory effect than  
 422 that measured in the control fish throughout the experimental period ( $P < 0.05$ ).  
 423



424  
 425 **Fig. 5.** Humoral innate immune parameters analyzed in fish plasma and serum at 6, 12 and 24  
 426 hour post injection (hpi) with Cr-glucan, Yb-glucan and PBS (control). (A) Total Ig, (B)  
 427 %Bactericidal activity, (C) Serum peroxidase, (D) Serum lysozyme activity, and (E) %Anti-  
 428 protease activity. The results were expressed as mean $\pm$ SD (n=6). Different letters stand for  
 429 statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.

430

### 431 3.3 Effects of Cr-glucan on skin mucosal immune parameters

432 Besides the immune response function in the blood, the mucosal immunity is  
 433 interesting to elucidate because it is considerably as a first barrier to protect the fish against  
 434 pathogens entering through the skin surface. Therefore, the activity of peroxidase and  
 435 lysozyme in the fish skin mucus was determined in response to Yb-glucan and Cr-glucan  
 436 treatments.

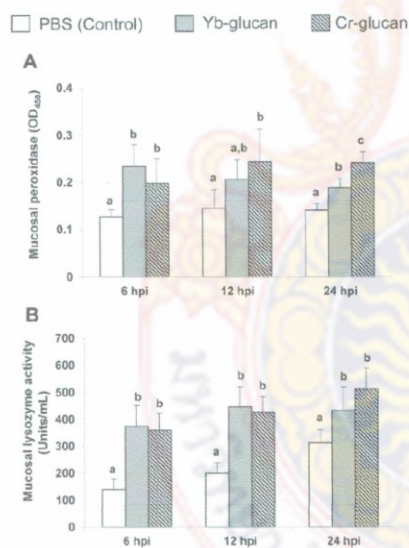
437

438 3.3.1 Mucosal peroxidase activity

439 Both Yb-glucan and Cr-glucan showed statistically induction of peroxidase activity  
 440 over the control at all time-points (Fig. 6A). However, at 12 hpi the level in Yb-glucan did  
 441 not significantly different ( $P>0.05$ ) compared to the control. Although the peroxidase activity  
 442 induced by glucans examined in the skin mucus was likely to be more constant compared to  
 443 that presented in the serum, the detection level was about 2-fold lower than observed in  
 444 serum (Fig. 5C)

445 3.3.2 Mucosal lysozyme activity

446 The mucosal lysozyme activities (Fig. 6B) were corresponding to those exhibited in  
 447 the fish sera (Fig. 5D) in terms of pattern while the lower level was detected. The activity was  
 448 significantly induced ( $P<0.05$ ) in the fish injected with Yb-glucan and Cr-glucan compared  
 449 to the control at 6, 12 and 24 hpi (Fig. 6B).



450

451 **Fig. 6.** Skin mucosal immune parameters analyzed in fish injected with Yb-glucan, Cr-glucan  
 452 and PBS (control) at 6, 12 and 24 hour post injection (hpi). (A) Peroxidase and (B) Lysozyme



453 activity. The results were expressed as mean±SD (n=6). Different letters stand for statistically  
454 significant differences ( $P<0.05$ ) between groups.

455

#### 456 3.4 Enhancement of immune-related genes stimulated by Cr-glucan

457 The qRT-PCR analysis of 5 immune-related genes; TLR2, JAK-1, IL-1 $\beta$ , TNF-1 $\alpha$ ,  
458 and NF-kB, in HK tissue of Nile tilapia treated with either Cr-glucan or Yb-glucan was  
459 performed in order to evaluate the immune stimulatory potential of Cr-glucan compared with  
460 that of Yb-glucan. The expression profiles of all genes are present in Fig. 7.

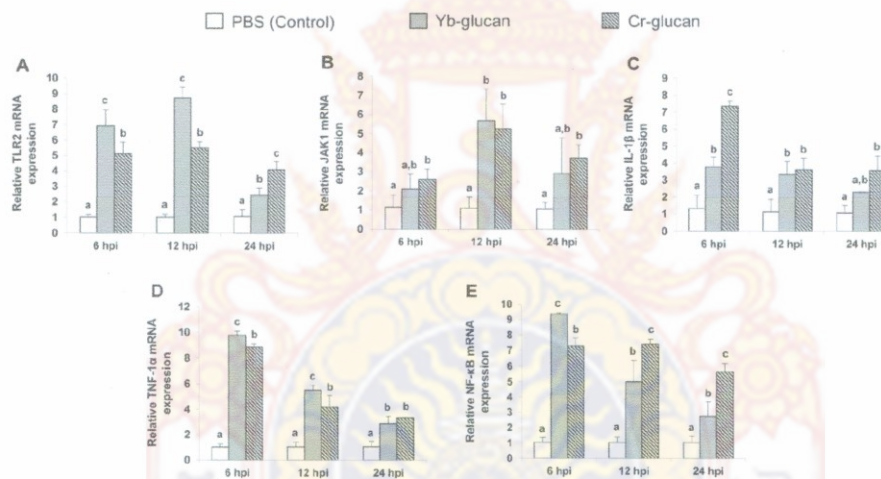
461 The similar pattern of TLR2 gene was obtained in the treatments of both tested  
462 glucans which was significantly higher ( $P<0.05$ ) than that of the control (PBS) throughout  
463 the experimental period Fig. 7A. This gene was induced at 6 and 12 h then decreased at 24 h.  
464 In addition, Yb-glucan showed significantly higher expression level than did Cr-glucan at 6  
465 and 12 h while the level was reversed at 24 hpi Fig. 7A.

466 JAK1 expression pattern was corresponding to that of TLR2 gene, however, only the  
467 fish treated with Cr-glucan expressed significantly greater level ( $P<0.05$ ) than that of the  
468 control at all time points detected. Yb-glucan only induced significantly higher level  
469 ( $P<0.05$ ) than that of the control at 12 hpi Fig. 7B.

470 The expressions of genes considered as the key mediators of the inflammatory  
471 response and regulation of immune cells including IL-1 $\beta$ , TNF-1 $\alpha$ , and NF-kB were also  
472 analyzed. We observed that the pattern of IL-1 $\beta$  (Fig. 7C) and TNF-1 $\alpha$  (Fig. 7D) were  
473 parallel in both glucan treatments. An elevated level of these 2 genes were detected at 6 h  
474 post challenge then declined thereafter. Cr-glucan could significantly enhance the level of IL-  
475 1 $\beta$  gene ( $P<0.05$ ) compared with the Yb-glucan treatment at 6 hpi while there was no  
476 significant difference ( $P>0.05$ ) between the glucan treatments at 12 and 24 h (Fig. 7C).  
477 However, the prolonged induction of IL-1 $\beta$  gene was observed at 24 hpi in fish injected with

478 Cr-glucan. Moreover, Cr-glucan and Yb-glucan showed apparently up-regulation level  
 479 ( $P < 0.05$ ) of TNF-1 $\alpha$  than did control along the experimental period. Yb-glucan significantly  
 480 induced higher expression than that of Cr-glucan at 6 and 12 hpi (Fig. 7D).

481 For the expression profile of NF-kB, the up-regulation induced by Cr-glucan and Yb-  
 482 glucan were observed at all detection time points compared with the control (Fig. 7E). The  
 483 trend of this gene was quite similar in both glucan treatments; the mRNA level was decreased  
 484 at later time points. However, the different senses of decrease were detected. In the Yb-  
 485 glucan treatment, the expression level was dramatically declined while its level seemed to be  
 486 stable and gradually decreased in the Cr-glucan treatment. In addition, there was statistically  
 487 difference ( $P < 0.05$ ) in the level of this gene stimulated by Cr-glucan and Yb-glucan (Fig. 7E)

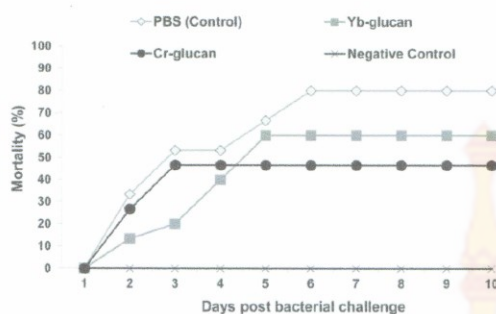


488  
 489 Fig. 7. The expression profile of immune-related genes in HK of Nile tilapia treated with Cr-  
 490 glucan, Yb-glucan and PBS (control) at 6, 12 and 24 hour post injection (hpi). (A) TLR2, (B)  
 491 JAK1, (C) IL-1 $\beta$ , (D) TNF-1 $\alpha$ , and (E) NF-kB. The results were expressed as mean  $\pm$  SD  
 492 ( $n=6$ ). Bars and different letters stand for statistically significant differences ( $P < 0.05$ )  
 493 between groups.

494

495 3.5 Improvement of disease resistance against *A. veronii* infection triggered by Cr-glucan  
496 Immunostimulatory effect to trigger the disease resistance in fish against pathogenic  
497 bacterial infection was compared between treatment with Cr-glucan and Yb-glucan. Nile  
498 tilapia was first i.p. injection with either Cr-glucan or Yb-glucan and PBS as control. Six h  
499 after glucan injection, *A. veronii* was challenged to each treated fish and the number of dead  
500 fish was daily recorded for 10 days. Every dead fish exhibited the clinical signs associated  
501 with *A. veronii* infection, for example, reddened fins, external/internal septicemia, and iridial  
502 hemorrhage. The percentage mortality of Nile tilapia after bacterial challenge is present in  
503 Fig. 8. All treatments started to succumb 2 days after *A. veronii* challenge. At the beginning  
504 the %mortality in the Cr-glucan treatment rapidly increased similar to the control group,  
505 however, it reached a plateau of 47% at 4 days after bacterial challenge until the end of the  
506 experiment. Yb-glucan caused gradually increase of mortality percentage until day 3 then the  
507 number of dead fish raised 3-fold from day 3 to day 5. The steady mortality level (60%  
508 mortality) in Yb-glucan group was observed higher than that of Cr-glucan about 10% after 5  
509 days. The highest mortality (80% mortality) was recorded in the control group at 6 days after  
510 bacterial challenge. As aforementioned, to ensure that the fish death was associated with *A.*  
511 *veronii* infection, the pathogenic bacteria in brain were isolated and cultured. The result  
512 showed that *Aeromonas* spp. was detected in the brain of every dead fish. The negative  
513 control group, unchallenged with *A. veronii*, showed 100% survival with no clinical sign as  
514 well as no pathogen detected in blood and brain of fish randomly checked at 10 days (end  
515 time-point).





516

517 **Fig. 8.** Mortality of Nile tilapia i.p. injected with PBS (control) or Yb-glucan or Cr-glucan  
 518 and challenged 6 h later with i.p. injection of *A. veronii* ( $10^7$  CFU/fish, n=12 in triplicate).

519

## 520 Discussion

521 Although  $\beta$ -glucan derived from yeast, especially *S. cerevisiae*, has been demonstrated  
 522 as the potent immunostimulant enhancing innate immunity and increasing the disease  
 523 resistance against pathogens in various aquatic animals [49–52], the mushroom  $\beta$ -glucan has  
 524 been attractively used in aquaculture [23–27]. Most of the mushroom  $\beta$ -glucans are ordinarily  
 525 isolated from mycelium, fruiting body and basidocarp, this present work differently used the  
 526 mycelia within the by-product mushroom cultivation pulp after harvesting as the source of  $\beta$ -  
 527 glucan. Autoclaving or pressurized hot water extraction was used to extract the glucan from  
 528 by-product mushroom cultivation pulp of split gill mushroom, *S. commune*. The results  
 529 indicated that the obtained crude glucan contained a major component of carbohydrate which  
 530 characterized as  $\beta$ -(1→3) (1→6)-glucan, and residues of protein, phenolic compounds and  
 531 lipid. The yield and constituents was similarly to the polysaccharides obtained from  
 532 *Macrocybe gigantean* [31]. The soluble glucan, Cr-glucan comprises approximately 97% of  
 533  $\beta$ -glucan and the rest 3% of  $\alpha$ -glucan.

534 Even the administration route of  $\beta$ -glucan treated to the aquatic animals is highlighted  
 535 as feeding or oral administration, injection was conducted since we intended to compare the

536 effect of exactly equal amount of our Cr-glucan and commercial Yb-glucan that applied into  
537 the fish body.  $\beta$ -glucan is not produced in animals and recognized as a non-self molecule  
538 which has been demonstrated to effectively enhance innate and acquired immunity. Many  
539 evidences have proved the effects of  $\beta$ -glucan on innate immunity induction including  
540 respiratory burst, leukocyte activation, stimulation of phagocytosis and antimicrobial  
541 activities, releasing certain types of cytokines, and responsive enzymes and proteins  
542 [3,7,53,54], this research therefore focused on comparative study of innate immune responses  
543 in Nile tilapia after perception of Cr-glucan and Yb-glucan.

544 Hematological parameters are diagnostic tool which has raised attention for reveal  
545 fish health and stress. WBC also termed leukocyte is also noticeably as an immunocompetent  
546 cell functioning in immune response and an important indicator of the fish health because it is  
547 the first line and play a crucial role in innate immunity therefore increasing of WBC number  
548 could indicate the induced immune status in fish [55,56]. We found that the number of WBC  
549 and PLT was significantly increased in the fish injected with both glucan compared to the  
550 control (Fig. 2). This finding was corresponding with other works reporting the increased  
551 number of WBC in fish after stimulation with various immunostimulants, for example, *O.*  
552 *niloticus* treated with *Excoecaria agallocha* leaf extracts [2], hybrid *O. niloticus*  $\times$  *O. aureus*  
553 fed with garlic [57] and Asian seabass injected with CpG ODNs [12]. Recently, thrombocyte  
554 has been suggested its role in fish defense response since its increased level has been detected  
555 under certain conditions. However, the actual function of thrombocyte in immunity is not yet  
556 elucidated [58,59].

557 The kinetics distribution of different leukocyte types was monitored in this study (Fig.  
558 3 and Fig. 4). Monocyte, a leukocyte type mainly contributing in phagocytosis, was earlier  
559 increased after Yb-glucan and Cr-glucan then decreased in the different sense. Contrary to  
560 granulocyte and lymphocyte those were increased in later time-points after Yb-glucan and

561 Cr-glucan. Granulocytes, comprising neutrophil, eosinophil and basophil, play a role in  
562 phagocytosis and releasing mediators associated with inflammation whereas lymphocyte is  
563 responsible for the extraordinary adaptive immune system. A few researches have  
564 demonstrated the dynamics shift of differential leukocyte towards time course determination  
565 after exposure to pathogen [60] and various stimuli [61,62]. The increased number of  
566 differential leukocyte has been showed upon pathogen infection [63] compared to the un-  
567 infected control, however, the description of this phenomenon has not been completely  
568 discovered.

569 Administration of  $\beta$ -glucan has been prove to stimulate humoral immune parameters  
570 in various aquatic animals, for example, *Labeo rohita* [64], orange spotted grouper,  
571 *Epinephelus coioides* [8], *Dicentrarchus labrax* [14]. Humoral immune parameters were  
572 determined in blood and mucus since circulating immune cell and skin mucus are  
573 encountered with the invading pathogens, the produced immune-related substances could act  
574 in concert to protect the host and restrict the pathogen spread [65,66]. Although the  
575 knowledge regarding defense mechanisms of skin mucus in fish is still limited, the  
576 constitutive and inducible innate mechanisms are increasingly noticed. In fish injected with  
577 either Cr-glucan or Yb-glucan in this study, the defense responsive proteins detected in blood  
578 and mucus were corresponding in terms of induction pattern (Fig. 5 and Fig. 6). Guadiola et  
579 al. [65] showed the comparative responsive protein levels in mucus and serum of gilthead  
580 seabream; skin mucosal peroxidase was lower whereas similar level of lysozyme was  
581 reported. In addition, the peroxidase was detected higher in mucus of fish exposed to acute  
582 crowded compared to control [38]. According to the obtained results, Cr-glucan exhibited the  
583 immunostimulatory efficiency as did the Yb-glucan (Fig. 5 and Fig. 6). Globulins have been  
584 reported as immunological active proteins in blood which play the important role in fish  
585 innate immunity. Both Cr-glucan and Yb-glucan could induce the production and



586 accumulation of Ig corresponding with the detected lysozyme and protease inhibitor, those  
587 involved in destroying bacterial pathogen cells. Lysozymes, one of the compounds relevance  
588 to kill bacteria, are typically used as indicator of non-specific or innate immune response in  
589 fish against invading pathogen since their activity involves the annihilation of Gram-positive  
590 and Gram-negative bacterial cell wall [55,67]. As expected, lysozyme activity was  
591 corresponding with the bactericidal activity in glucan-treated fish suggesting the immune  
592 function of lysozyme resulting in ability to destroy bacterial cells. During invasion,  
593 pathogenic bacteria produce proteases in order to destroy protein constituents in host tissue  
594 therefore these enzymes are thought to be virulence factors [68–70]. Host cells secrete several  
595 protease inhibitors which counterattack the pathogen protease to protect themselves [71–72].  
596 Interestingly, Cr-glucan from the by-product mushroom cultivation pulps exhibited stronger  
597 immunostimulatory efficacy than did Cr-glucan since it could prolong the appearance of total  
598 Ig, bactericidal activity and lysozyme activity.

599 To get more detail in the effectiveness of Cr-glucan, the important factors involving in  
600 response to  $\beta$ -glucan was studied at the transcriptional level compared to that triggered by  
601 Yb-glucan. There have been demonstrated the ability of  $\beta$ -glucan to stimulate the pro-  
602 inflammatory mediators *in vivo* and *in vitro* [73–75]. TLR2 has also been proposed as a key  
603 mediator which recognizes fungal glucan then mediated by signal transducer and activator of  
604 transcription (STAT) leading to the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and pro-inflammatory  
605 cytokine production [76,77]. However, there is another different signal transduction which  
606 associate with Jak, a member of one subgroup of non-receptor protein tyrosine kinase,  
607 mediates the effect of cytokines [78]. Therefore, qRT-PCR was performed to analyze the  
608 expression of different signaling mediator, TLR2 and JAK1, pro-inflammatory cytokine  
609 genes, IL-1 $\beta$  and TNF-1 $\alpha$  and a transcription factor NF- $\kappa$ B. This present study is the first  
610 evidence demonstrating that  $\beta$ -glucan from a by-product mushroom *S. commune* cultivation

611 pulps (Cr-glucan) up-regulated the genes of receptor and signal transduction, TLR2 and  
612 JAK1, important cytokines IL-1 $\beta$  and TNF-1 $\alpha$  which has diverse physiological functions and  
613 roles in regulating the inflammatory process as well as a nuclear transcription factor NF-kB  
614 which is the endpoint of a series of signal transduction events involving in many biological  
615 processes (Fig. 7). Regarding to all studied immune-related genes, our Cr-glucan could  
616 trigger the up-regulation in the similar pattern as did Yb-glucan compared to the control  
617 group. The different gene induction behavior was noticed that Yb-glucan induced obviously  
618 higher gene expression levels for TLR2, JAK1, TNF-1 $\alpha$  and NF-kB at earlier 6 and 12 hpi  
619 then most genes become significantly lower at 24 hpi while Cr-glucan extended the high  
620 expression level until 24 hpi.

621         The efficiency of  $\beta$ -glucan to protect the host has been reported in various fish-  
622 pathogen models, for example, orange spotted grouper against *V. alginolyticus* [8], Nile  
623 tilapia against *A. hydrophila* [49], zebra fish against *A. hydrophilla* [79]. The disease  
624 resistance against the pathogenic bacteria *A. veronii* was established in the fish injected with  
625 Yb-glucan and Cr-glucan. The greater survival rate was recorded in Cr-glucan treatment  
626 followed by Yb-glucan and control (Fig. 8). The number of dead fish in the Cr-glucan  
627 treatment was constant since 3 days after being challenged with *A. veronii* which faster than  
628 that of Yb-glucan group taken 5 days. The survival result was compatible with all detected  
629 immune parameters. Cr-glucan exhibited prolonged immune elicitation which could  
630 containment or kill the bacterial pathogen. An elevated expression level of immune-related  
631 genes altogether with the lysozyme, bactericidal activity and the high proportion of  
632 granulocytes which were relevant to the release of immune mediators and phagocytosis might  
633 be one of the rationales supporting this phenomenon. Interestingly, there might be some  
634 different defense mechanisms triggered by our Cr-glucan and Yb-glucan since the survival  
635 and the expression of immune parameters were obviously detected. The constituents within

636 these tested glucans are probably the clue; Cr-glucan is composed of mainly  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-  
637 glucan,  $\alpha$ -glucan, protein, phenolic compounds and lipid as aforementioned while Yb-glucan  
638 is a glucan containing  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-glucan with purity of  $\geq$  98%. The other molecules  
639 may have the abilities underlying immune enhancement or anit-stress which can improve the  
640 fish health and immune system.

641 In conclusion, this study provides the first evidence demonstrating that crude glucan  
642 extracted from by-product cultivation pulps of split gill mushroom, *S. commune*, has a strong  
643 potency as the immunostimulant enhancing innate immune responses in Nile tilapia and  
644 disease resistant against *A. veronii* infection. The obtained crude glucan could trigger the  
645 cellular and humoral immune parameters as well as up-regulation of immune-related genes in  
646 a similar manner as did commercial yeast  $\beta$ -glucan which has been considerably effective  
647 immunostimulants used in aquaculture for decades. The source of crude glucan used in this  
648 study was the valueless by-product of wood decay fungi which might be harmful for the  
649 environment in case of improper management. According to our results, it is thus attractive to  
650 be used as an alternative source of  $\beta$ -glucan applied in aquaculture. These findings encourage  
651 further research on the enhancement and development of new glucan as natural  
652 immunnostimulant or dietary supplement underneath sustainable and environmental friendly  
653 approach in aquaculture.

654

#### 655 **Acknowledgments**

656 This research was a part of the project granted by the National Research Council of  
657 Thailand (NRCT) and Rajamangala University of Technology Srivijaya (Project no. 183848).  
658 We would like to thank Assoc. Prof. Dr. Kanokphorn Sangkharak, Thaksin University and  
659 Dr. Onnicha Rattanaporn, Prince of Songkla University for assistance in FTIR analysis and  
660 helping at various stages.



636 these tested glucans are probably the clue; Cr-glucan is composed of mainly  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-  
637 glucan,  $\alpha$ -glucan, protein, phenolic compounds and lipid as aforementioned while Yb-glucan  
638 is a glucan containing  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)-glucan with purity of  $\geq$  98%. The other molecules  
639 may have the abilities underlying immune enhancement or anit-stress which can improve the  
640 fish health and immune system.

641 In conclusion, this study provides the first evidence demonstrating that crude glucan  
642 extracted from by-product cultivation pulps of split gill mushroom. *S. commune*, has a strong  
643 potency as the immunostimulant enhancing innate immune responses in Nile tilapia and  
644 disease resistant against *A. veronii* infection. The obtained crude glucan could trigger the  
645 cellular and humoral immune parameters as well as up-regulation of immune-related genes in  
646 a similar manner as did commercial yeast  $\beta$ -glucan which has been considerably effective  
647 immunostimulants used in aquaculture for decades. The source of crude glucan used in this  
648 study was the valueless by-product of wood decay fungi which might be harmful for the  
649 environment in case of improper management. According to our results, it is thus attractive to  
650 be used as an alternative source of  $\beta$ -glucan applied in aquaculture. These findings encourage  
651 further research on the enhancement and development of new glucan as natural  
652 immunnostimulant or dietary supplement underneath sustainable and environmental friendly  
653 approach in aquaculture.

654

#### 655 **Acknowledgments**

656 This research was a part of the project granted by the National Research Council of  
657 Thailand (NRCT) and Rajamangala University of Technology Srivijaya (Project no. 183848).  
658 We would like to thank Assoc. Prof. Dr. Kanokphorn Sangkharak, Thaksin University and  
659 Dr. Onnicha Rattanaporn, Prince of Songkla University for assistance in FTIR analysis and  
660 helping at various stages.

661 **References**

- 662 [1] Y. Gao, J. Lee, Compensatory responses of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* under  
663 different feed-deprivation regimes, *Fish Aquatic Sci* 15 (2012) 305–3011.
- 664 [2] A.A. Laitha, A.G. Mazlana, A.W. Effendya, M.A. Ambakb, W.W.I. Nurhafizaha, A.S.  
665 Aliaa, A. Jabarc, M. Najiah, Effect of *Excoecaria agallocha* on non-specific immune  
666 responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus*  
667 *agalactiae*, *Res Vet Sci.* 112 (2017) 192–200.
- 668 [3] D.K. Meena, P. Das, S. Kumar, S.C. Mandal, A.K. Prusty, S.K. Singh, M.S. Akhtar, B.K.  
669 Behera, K. Kumar, A.K. Pal, S.C. Mukherjee, Beta-glucan: an ideal immunostimulant in  
670 aquaculture (a review), *Fish Physiol. Biochem.* 39 (3) (2013) 431–457.
- 671 [4] G.W. Njagi, S. Lee, S. Won, J. Hong, A. Hamidoghli, S.C. Bai, Effects of dietary Yucca  
672 meal on growth, haematology, non-specific immune responses and disease resistance of  
673 juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), *Aquac. Res.* 48, (8)  
674 (2017) 4399–4408.
- 675 [5] Y. Yu, C. Wang, A. Wang, W. Yang, F. Lv, F. Liu, B. Liu, C. Sun, Effects of various  
676 feeding patterns of *Bacillus coagulans* on growth performance, antioxidant response and  
677 Nrf2-Keap1 signaling pathway in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), *Fish*  
678 *Shellfish Immunol.* 73 (2018) 75–83.
- 679 [6] S.R. Kumar, V. Parameswaran, V.P.I. Ahmed, S.S. Musthaq, A.S.S. Hameed, Protective  
680 efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio*  
681 *anguillarum*, *Fish Shellfish Immunol.* 23 (2) (2007) 316–326.
- 682 [7] R.A. Dalmo, J. Bogwald, Beta-glucans as conductors of immune symphonies, *Fish*  
683 *Shellfish Immunol.* 25 (4) (2008) 384–396.

- 684 [8] C.S. Chang, S.L.Huang, S. Chen, S.N. Chen, Innate immune responses and efficacy of  
685 using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus*  
686 *coioides*, aquaculture, Fish Shellfish Immunol. 35 (1) (2013) 115–125.
- 687 [9] A.G. Murray, E.J. Peeler, A framework for understanding the potential for emerging  
688 diseases in aquaculture, Prev. Vet. Med. 67 (2–3) (2005) 223–235.
- 689 [10] H.Y. Done, A.K. Venkatesan, R.U. Halden, Does the recent growth of aquaculture create  
690 antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production  
691 in agriculture?, AAPS J 17 (3) (2015) 513–524.
- 692 [11] E. Wang, X. Chen, K. Wang, J. Wang, D. Chen, Y. Geng, W. Lai, X. Wei, Plant  
693 polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease  
694 resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish, Fish Shellfish Immunol. 59  
695 (2016) 196–202.
- 696 [12] K. U-taynapun, N. Chirapongsatonkul, T. Itami, C. Tantikitti, CpG ODN mimicking  
697 CpG rich region of myxosporean *Myxobolus supamattayai* stimulates innate immunity  
698 in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and defense against *Streptococcus iniae*, Fish  
699 Shellfish Immunol. 58 (2016) 116–124.
- 700 [13] A. Bonaldo, K.D. Thompson, A. Manfrin, A. Adams, E. Murano, A.L. Mordenti, P.P.  
701 Gatta, The influence of dietary  $\beta$ -glucans on the adaptive and innate immune responses  
702 of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) vaccinated against vibriosis, Ital. J.  
703 Anim. Sci. 6 (2007) 151–164.
- 704 [14] M. Bagni, N. Romano, M.G. Finola, L. Abelli, G. Scapigliati, P.G. Tiscar, M. Sarti, G.  
705 Marino, Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and  
706 alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus*  
707 *labrax*), Fish Shellfish Immunol. 18 (4) (2005) 311–325.



- 708 [15] S.M. Paulsen, R.E. Engstad, B. Robertsen, Enhanced lysozyme production in Atlantic  
709 salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial  
710 lipopolysaccharide, *Fish Shellfish Immunol.* 11 (1) (2001) 23–37.
- 711 [16] J.B. Jørgensen, H. Lunde, B. Robertsen, Effect of a yeast-cell-wall glucan on the  
712 bactericidal activity of rainbow trout macrophages, *Fish Shellfish Immunol.* 3 (4)  
713 (1993) 267–277.
- 714 [17] B. Djordjevic, S. Skugor, S.M. Jorgensen, M. Overland, L.T. Myland, A. Krasnov,  
715 Modulation of splenic immune response to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout  
716 (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinin, a  $\beta$ -glucan from mushroom *Lentinula edodes*,  
717 *Fish Shellfish Immunol.* 26 (2) (2009) 201–209.
- 718 [18] J. Douxfils, C. Fierro-Castro, S.N. Mandiki, W. Emile, L. Tort, P. Kestemont, Dietary  $\beta$ -  
719 glucans differentially modulate immune and stress-related gene expression in lymphoid  
720 organs from healthy and *Aeromonas hydrophila*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus*  
721 *mykiss*), *Fish Shellfish Immunol.* 63 (2017) 285–296.
- 722 [19] W. Sirimanapong, K.D. Thompson, E.L. Ooi, M. Bekaert, B. Collet, J.B. Taggart, J.E.  
723 Bron, D.M. Green, A.P. Shinn, A. Adams, M.J. Leaver, The effects of feeding  $\beta$ -glucan  
724 to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to  
725 *Edwardsiella ictaluri*, *Fish Shellfish Immunol.* 47 (1) (2015) 595–605.
- 726 [20] F. Pilarski, C.A. Ferreira de Oliveira, F.P.B. Darpossolo de Souza, F.S. Zanuzzo,  
727 Different  $\beta$ -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile  
728 tilapia, *Fish Shellfish Immunol.* 70 (2017) 25–29.
- 729 [21] A.S. Salah, A.F. El Nahas, S. Mahmoud, Modulatory effect of different doses of  $\beta$ -  
730 1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-  
731 related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*, *Fish*  
732 *Shellfish Immunol.* 70 (2017) 204–213.

- 733 [22] L. Barsanti, V. Passarelli, V. Evangelista, A.M. Frassanito, P. Gualtieri, Chemistry,  
734 physic chemistry and applications linked to biological activities of  $\beta$ -glucans, Nat Prod  
735 Rep 28 (3) (2011) 457–466.
- 736 [23] A.B. Encarnacion, F. Fagutao, J. Hirayama, M. Terayama, I. Hirono, T. Ohshima, Edible  
737 mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in kuruma shrimp  
738 (*Marsupenaeus japonicus*), J. Food Sci. 76 (1) (2011) C52–8.
- 739 [24] R. Harikrishnan, C. Balasundaram, M.S. Heo, Diet enriched with mushroom *Phellinus*  
740 *linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of  
741 kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis, Fish Shellfish Immunol. 30 (1)  
742 (2011) 128–34.
- 743 [25] S.P. Yeh, L.F. Hsia, C.S. Chiu, S.T. Chiu, C.H. Liu, A smaller particle size improved the  
744 oral bioavailability of monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*, powder resulting  
745 in enhancement of the immune response and disease resistance of white shrimp,  
746 *Litopenaeus vannamei*, Fish Shellfish Immunol. 30 (6) (2011):1323–1330.
- 747 [26] C.F. Chang, M.S. Su, H.Y. Chen, C.F. Lo, G.H. Kou, I.C. Liao, Effects of dietary  $\beta$ -1,3-  
748 glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile  
749 *Penaeus monodon*, Dis. Aquat. Organ. 36 (1999) 163–168.
- 750 [27] C.F. Chang, H.Y. Chen, M.S. Su, I.C. Liao, Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1,3-glucan  
751 in the brooders of the black tiger shrimp *Panaeus monodon*, Fish Shellfish Immunol. 10  
752 (6) (2000) 505–514.
- 753 [28] Y.C. Wang, P.S. Chang, H.Y. Chen, Differential time-series expression of immune-  
754 related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary  
755 inclusion of  $\beta$ -1,3-glucan, Fish Shellfish Immunol. 24 (1) (2008) 113–121.
- 756 [29] S. Takemoto, H. Nakamura, Erwin, Y. Imamura, T. Shimane, *Schizophyllum commune*  
757 as a ubiquitous plant parasite, Jpn. Agric. Res. Q 44 (4) (2010) 357–364.

- 758 [30] J. Rytioja, K. Hildén, J. Yuzon, A. Hatakka, R.P. de Vries, M.R. Mäkelä, Plant-  
759 polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78  
760 (4) (2014) 614–649.
- 761 [31] S. Khatua, K. Acharya, Influence of extraction parameters on physic-chemical characters  
762 and antioxidant activity of water soluble polysaccharides from *Macrocybe gigantean*  
763 (Masse) Pegler & Lodge, *J Food Sci Tech* 53(4) (2016) 1878–1888.
- 764 [32] M. Dubois, A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Reders, F. Smith, Colorimetric method for  
765 determination of sugars related substances, *Anal. Chem.* 28 (3) (1956) 350–356.
- 766 [33] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the  
767 folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- 768 [34] T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* 58 (1981) 966–968.
- 769 [35] N. Ziestin, R. Ben-Zaker, Peroxidase activity presence of phenolic substance in  
770 peduncles of rose flowers, *Plant Physiol. Biochem.* 31 (1993): 333–339.
- 771 [36] National Research Council of Thailand, Ethical Principles and Guidelines for the Use of  
772 Animals for Scientific Purposes.  
773 <http://www.labanimals.net/images/Download/Ethics/Ethics%20Animal%20Eng.pdf>,  
774 1999 (accessed on 12 June 2016).
- 775 [37] C. Xu, E. Li, Y. Suo, Y. Su, M. Lu, Q. Zhao, J.G. Qin, L. Chen, Histological and  
776 transcriptomic responses of two immune organs, the spleen and head kidney, in Nile  
777 tilapia (*Oreochromis niloticus*) to long-term hypersaline stress, *Fish Shellfish*  
778 *Immunol.* 76 (2018) 48–57.
- 779 [38] F.A. Guardiola, A. Cuesta, M.A. Esteban, Using skin mucus to evaluate stress in  
780 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 59 (2016) 323–330.
- 781 [39] M.A. Esteban, J. Muñoz, J. Mesequer, Blood Cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax*  
782 L.). Flow cytometric and microscopic studies, *Anat Rec* 258 (1) (2000) 80–89.



- 783 [40] S. Khosravi, S. Rahimnejad, M. Herault, V. Fournier, C.R. Lee, H.T. Dio Bui, J.B.  
784 Jeong, K.J. Lee, Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets  
785 on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus*  
786 *major*, Fish Shellfish Immunol. 45 (2) (2015) 858–868.
- 787 [41] Y. Vasudeva Rao, B.K. Das, P. Jyotymayee, R. Chakrabarti, Effect of *Achyranthes*  
788 *aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas*  
789 *hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. 20 (3) (2006): 263–273.
- 790 [42] S.M. Aly, Y. Abdel-Galil Ahmed, A. Abdel-Aziz Ghareeb, M.F. Mohamed, Studies on  
791 *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune  
792 response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge  
793 infections, Fish Shellfish Immunol. 25 (1–2) (2008) 128–136.
- 794 [43] C.C. Lazado, P.V. Skov, P.B. Pedersen, Innate immune defenses exhibit circadian  
795 rhythmicity and differential temporal sensitivity to a bacterial endotoxin in Nile tilapia  
796 (*Oreochromis niloticus*), Fish Shellfish Immunol. 55 (2016) 613–622.
- 797 [44] D. Christyapita, M. Divyagnaneswari, R.D. Michael, Oral administration of *Eclipta*  
798 *alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease  
799 resistance of *Oreochromis mossambicus*, Fish Shellfish Immunol. 23 (4) (2007) 840-  
800 852.
- 801 [45] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time  
802 quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method, Methods 25 (2001) 402–408.
- 803 [46] J.M. Lim, J.H. Joo, H.O. Kim, H.M. Kim, S.W. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun, Structural  
804 and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial  
805 culture of *Collybia maculate* TG-1, Carbohydr Polym 61 (3) (2005) 296–303.
- 806 [47] A. Synytsya, K. Mičková, A. Synytsya, I. Jablonský, J. Spěváček, V. Erban, E.  
807 Kovářiková, J. Čopíková, Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus*

- 808 *ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity, Carbohydr  
809 Polym 76(4) (2009) 548–556.
- 810 [48] A. Klaus, M. Kozarski, M. Niksic, D. Jakovljevic, N. Todorovic, L.J.T.D. Van  
811 Griensven, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides  
812 extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, LWT - Food Sci Technol 44  
813 (10) (2011) 2005–2011.
- 814 [49] M.E. El-Boshy, A.M. El-Ashram, F.M. AbdelHamid, H.A. Gadalla, Immunomodulatory  
815 effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, *beta-glucan* and laminaran in mercuric  
816 chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with  
817 *Aeromonas hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. 28 (5–6) (2010) 802–808.
- 818 [50] A. Gopalakannan, V. Arul, Enhancement of the innate immune system and disease-  
819 resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of  $\beta$ -glucan and whole cell  
820 yeast. Aquac. Res. 41 (6) (2010) 884–892.
- 821 [51] H.D. Huu, H.M. Sang, N.T. Thanh Thuy, Dietary  $\beta$ -glucan improved growth  
822 performance, *Vibrio* counts, haematological parameters and stress resistance of  
823 pompano fish, *Trachinotus ovatus* Linnaeus, 1758, Fish Shellfish Immunol. 54 (2016)  
824 402–410.
- 825 [52] M.A.O. Dawood, S. Koshio, M. El-Sabagh, B.M.D. Masum, A.I. Zaineldin, M.M.  
826 Zayed, O.A.A. El-Dein, Changes in the growth, humoral and mucosal immune  
827 responses following  $\beta$ -glucan and vitamin C administration in red sea bream, *Pagrus*  
828 *major*, Aquaculture 470 (2017) 214–222.
- 829 [53] G.D. Brown, S. Gordon, Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans, Cell. Microbiol. 7 (4)  
830 (2005) 471–479.

- 831 [54] T. Cárdenas-Reyna, C. Angulo, C. Guluarte, S. Hori-Oshima, M. Reyes-Becerril, In  
832 vitro immunostimulatory potential of fungal  $\beta$ -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus*  
833 *peru*) cells, *Dev. Comp. Immunol.* 77 (2017) 350–358.
- 834 [55] C. Uribe, H. Folch, R. Enriquez, G. Moran, Innate and adaptive immunity in teleost fish:  
835 a review. *Vet Med* 56 (10) (2011) 486–503.
- 836 [56] S. Kumar, R.P. Raman, P.K. Pandey, S. Mohanty, A. Kumar, K. Kumar, Effect of orally  
837 administered azadirachtin on non-specific immune parameters of goldfish *Carassius*  
838 *auratus* (Linn. 1758) and resistance against *Aeromonas hydrophila*, *Fish Shellfish*  
839 *Immunol.* 34 (2) (2013) 564–573.
- 840 [57] D. Ndong, J. Fall, The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune  
841 responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*  $\times$  *Oreochromis aureus*). *J. Clin.*  
842 *Immunol. Immunopathol. Res.* 3 (2011) 1–9.
- 843 [58] F.R.Bozzo, J.R.E. Moraes, F.R. Moraes, G.T. Pereira, M. Taveres-Dias, E.M. Onaka,  
844 Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in  
845 the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae), *J*  
846 *World Aquac Soc* 38 (2) (2007) 302–308.
- 847 [59] M. Taveres-Dias, F.R. Moraes, Leukocyte and thrombocyte values for channel catfish  
848 (*Ictalurus punctatus* Raf.), with an assessment of morphologic, cytochemical and  
849 ultrastructural features, *Vet Clin Pathol* 36 (1) (2007) 49–54.
- 850 [60] M.E. van Wolfswinkel, M.C.C. Langenberg, L.J. Wammes, R.W. Sauerwein, R.  
851 Koelewijn, C.C. Hermsen, J.J. van Hellemond, P.J. van Genderen, Changes in total  
852 and differential leukocyte counts during the clinically silent liver phase in a controlled  
853 human malaria infection in malaria-naïve Dutch volunteers, *Malar. J.* 16 (2017) 457.



- 854 [61] P.G. Falso, C.A. Noble, J.M. Diaz, T.B. Hayes, The effect of long-term corticosterone  
855 treatment on blood cell differentials and function in laboratory and wild-caught  
856 amphibian models, *Gen. Comp. Endocrinol.* 212 (2015) 73–83.
- 857 [62] J.K. Sanzari, X.S. Wan, A. Muehlmann, L. Lin, A.R. Kennedy, Comparison of changes  
858 over time in leukocyte counts in *Yucatan minipigs* irradiated with simulated solar  
859 particle event-like radiation, *Life Sci Space Res* 4 (2015) 11–16.
- 860 [63] M.L. Martins, F.P. Vieira, G.T. Jerônimo, J.L.P. Mourino, G. Dotta, Leukocyte response  
861 and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp.,  
862 *Fish Physiol. Biochem.* 35 (1) (2009) 219–222.
- 863 [64] C.K. Misra, B.K. Das, S.C. Mukherjee, P. Pattnaik, Effect of long term administration of  
864 dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings,  
865 *Aquaculture* 255 (1–4) (2006) 82–94.
- 866 [65] F.A. Guardiola, A. Cuesta, M. Arizcun, J. Meseguer, M.A. Esteban, Comparative skin  
867 mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus*  
868 *aurata*), *Fish Shellfish Immunol.* 36 (2) (2014) 545–551.
- 869 [66] S.B. Hamed, M.J.T. Ranzani-Paiva, L. Tachibana, D.D.C. Dias, C.M. Ishikawa, M.A.  
870 Esteban, Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and  
871 interaction with host cells, *Fish Shellfish Immunol.* 80 (2018) 550–562.
- 872 [67] B. Magnadottir, Innate immunity of fish (overview), *Fish Shellfish Immunol.* 20 (2)  
873 (2006) 137–151.
- 874 [68] M.S. Lantz, Are bacterial proteases important virulence factors?, *J. Periodontal. Res.* 32  
875 (1997) 126–132.
- 876 [69] R. Hoge, A. Pelzer, F. Rosenau, S. Wilhelm, Weapons of a pathogen: proteases and their  
877 role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl.*  
878 *Microbiol. Microb. Biotechnol* 45 (2010) 383–395.

- 879 [70] M.C. Piazzon, J. Leiro, J. Lamas, Fish immunity to scuticociliate parasites, *Dev. Comp.*  
880 *Immunol.* 43 (2014) 280–289.
- 881 [71] Z.H. Wang, X.F. Zhao, J.X. Wang, Characterization, kinetics, and possible function of  
882 kazal-type proteinase inhibitors of Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*,  
883 *Fish Shellfish Immunol.* 26 (6) (2009) 885–897.
- 884 [72] V. Kumaresan, R. Harikrishnan, J. Arockiaraj, A potential Kazal-type serine protease  
885 inhibitor involves in kinetics of protease inhibition and bacteriostatic activity, *Fish*  
886 *Shellfish Immunol.* 42 (2) (2015) 430–438.
- 887 [73] S.C. Jaehrig, S. Rohn, L.W. Kroh, L.G. Fleischer, T. Kuz, In vitro potential antioxidant  
888 activity of (1-3), (1-6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces*  
889 *cerevisiae* cell wall, *J. Agric. Food Chem.* 55 (12) (2007) 4710–4716.
- 890 [74] E. Sonck, E. Stuyven, B. Goddeeris, E. Cox, The effect of beta-glucans on porcine  
891 leukocytes, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135 (2010) 199–207.
- 892 [75] M. Reyes-Becerril, F.A. Guardiola, V. Sanchez, M. Maldonado, C. Angulo,  
893 *Sterigmatomyces halophilus*  $\beta$ -glucan improves the immune response and bacterial  
894 resistance in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) peripheral blood leucocytes: *In*  
895 *vitro* study, *Fish Shellfish Immunol.* 78 (2018) 392–403.
- 896 [76] X. Hu, S.D. Chakravarty, L.B. Ivashkiv, Regulation of IFN and TLR signaling during  
897 macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms,  
898 *Immunol. Rev.* 226 (2008) 41–56.
- 899 [77] J.J. O'Shea, R. Plenge, JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and  
900 immune-mediated disease. *Immunity* 20 (2012) 542–550.
- 901 [78] L.Y. Chai, B.J. Kullberg, A.G. Vonk, A. Warris, A. Cambi, J.P. Latge, L.A. Joosten,  
902 J.W. van der Meer, M.G. Netea, Modulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4  
903 Responses by *Aspergillus fumigatus*, *Infect. Immun.* 77 (5) (2009) 2184–2192.

- 904 [79] I. Rodriguez, R. Chamorro, B. Novoa, A. Figueras,  $\beta$ -glucan administration enhances  
905 disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish*  
906 *Shellfish Immunol.* 27 (2) (2009) 369–373.

907

908

909

910

911

912





913 **Supplementary data**

914

915 **Fig. S1.** Split gill mushroom by-product cultivation pulps, accumulated after harvesting, used  
916 in this study.



Figure 1  
Click here to download high resolution image

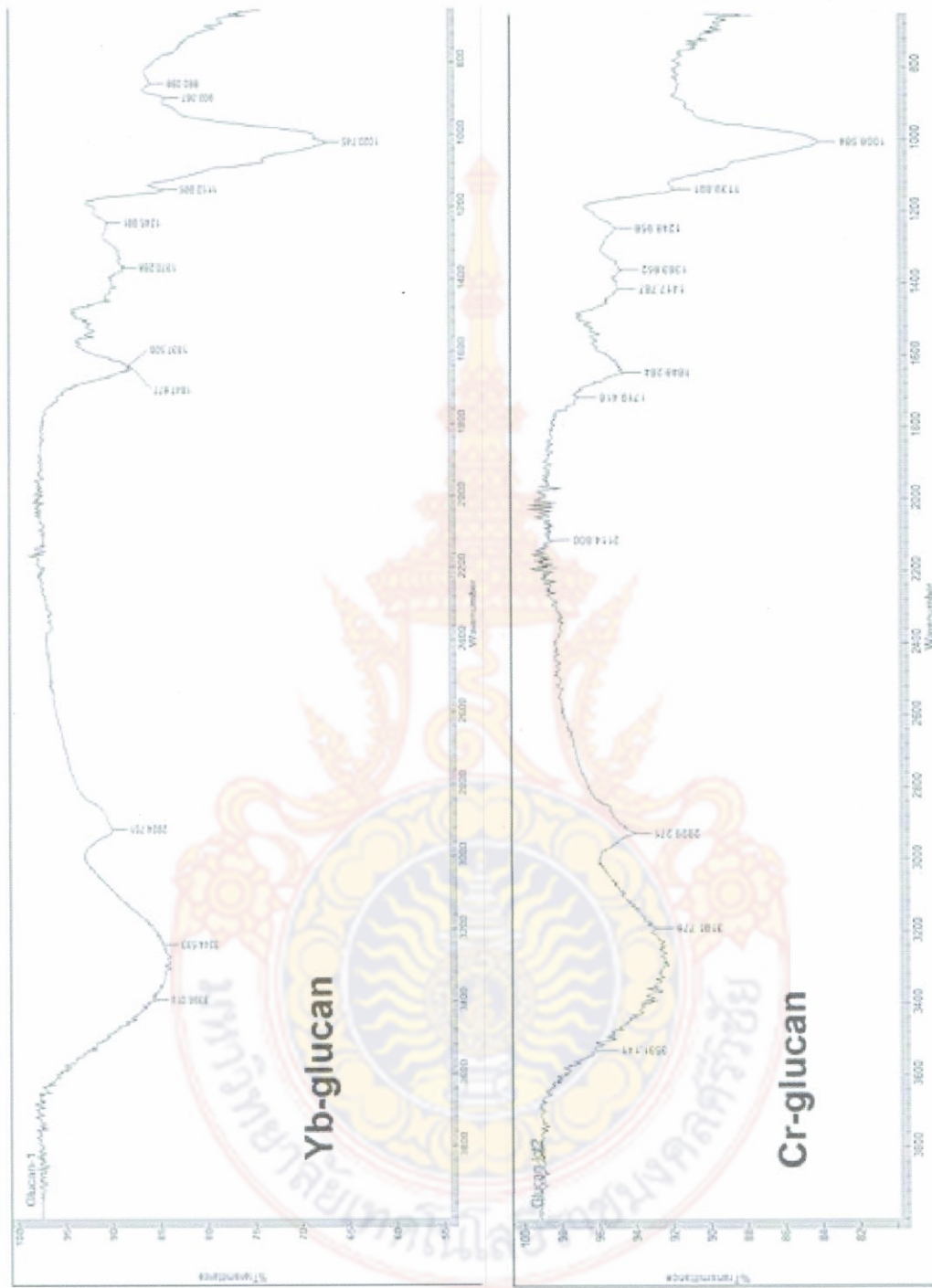


Figure 2  
 Click here to download high resolution image

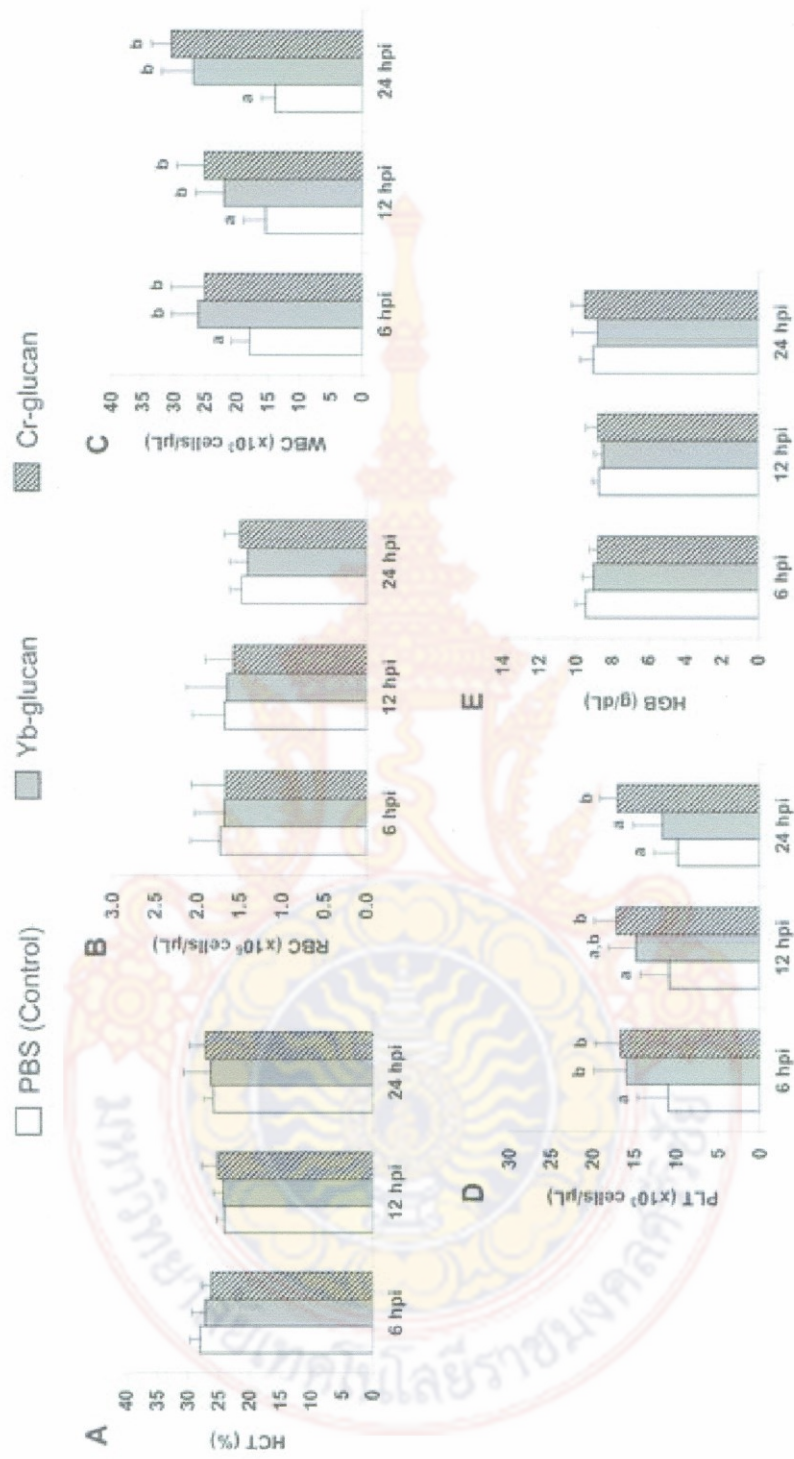
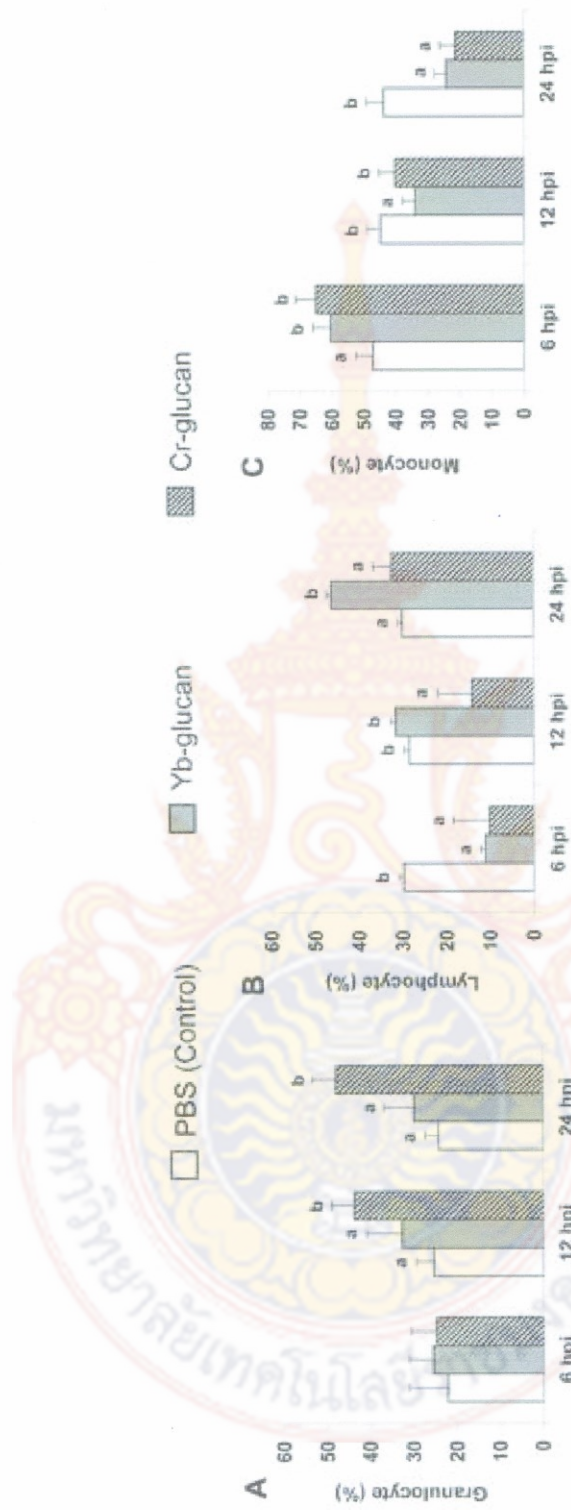




Figure 3  
 Click here to download high resolution image



**Figure 4**  
[Click here to download high resolution image](#)



**Figure 3**  
[Click here to download high resolution image](#)

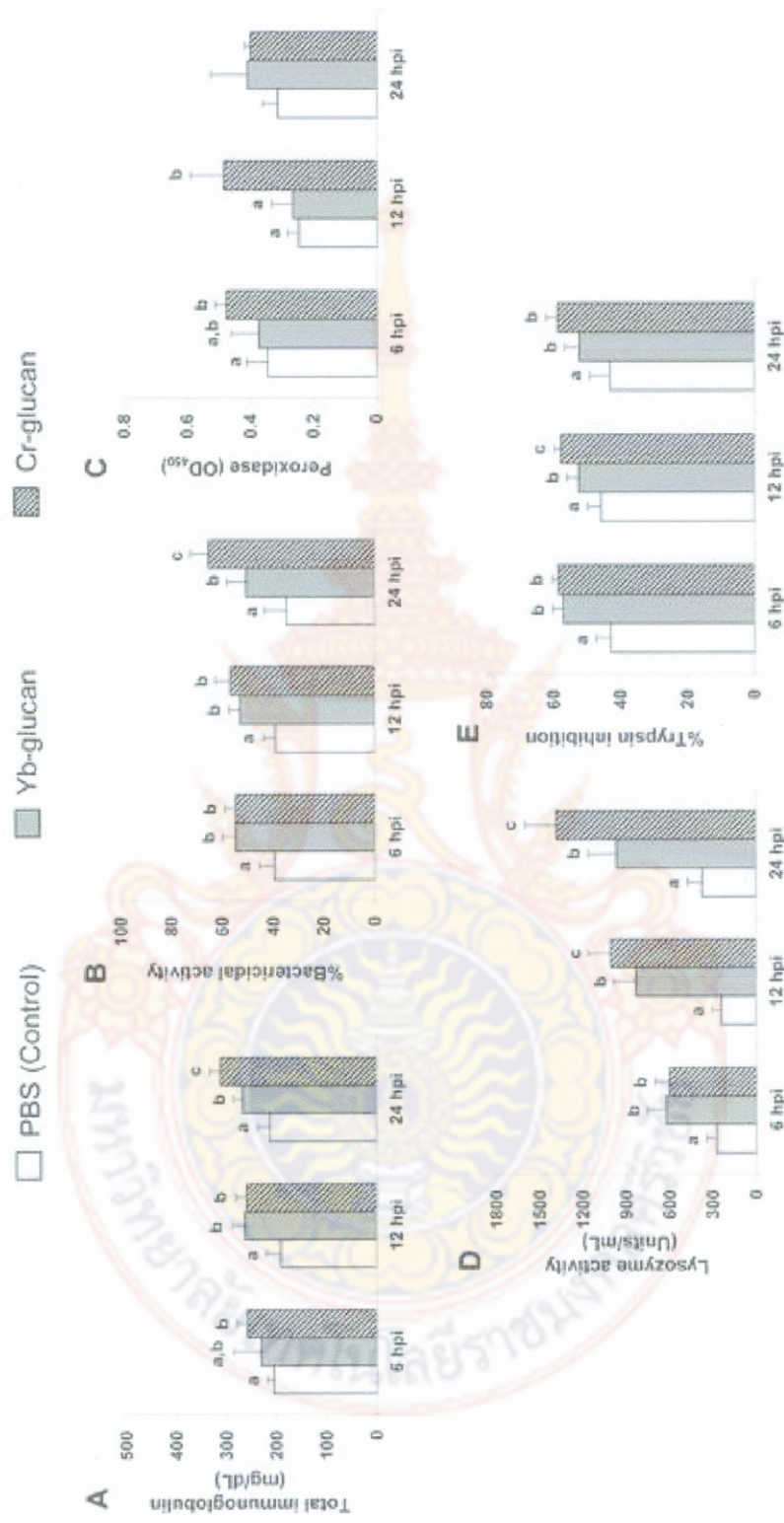
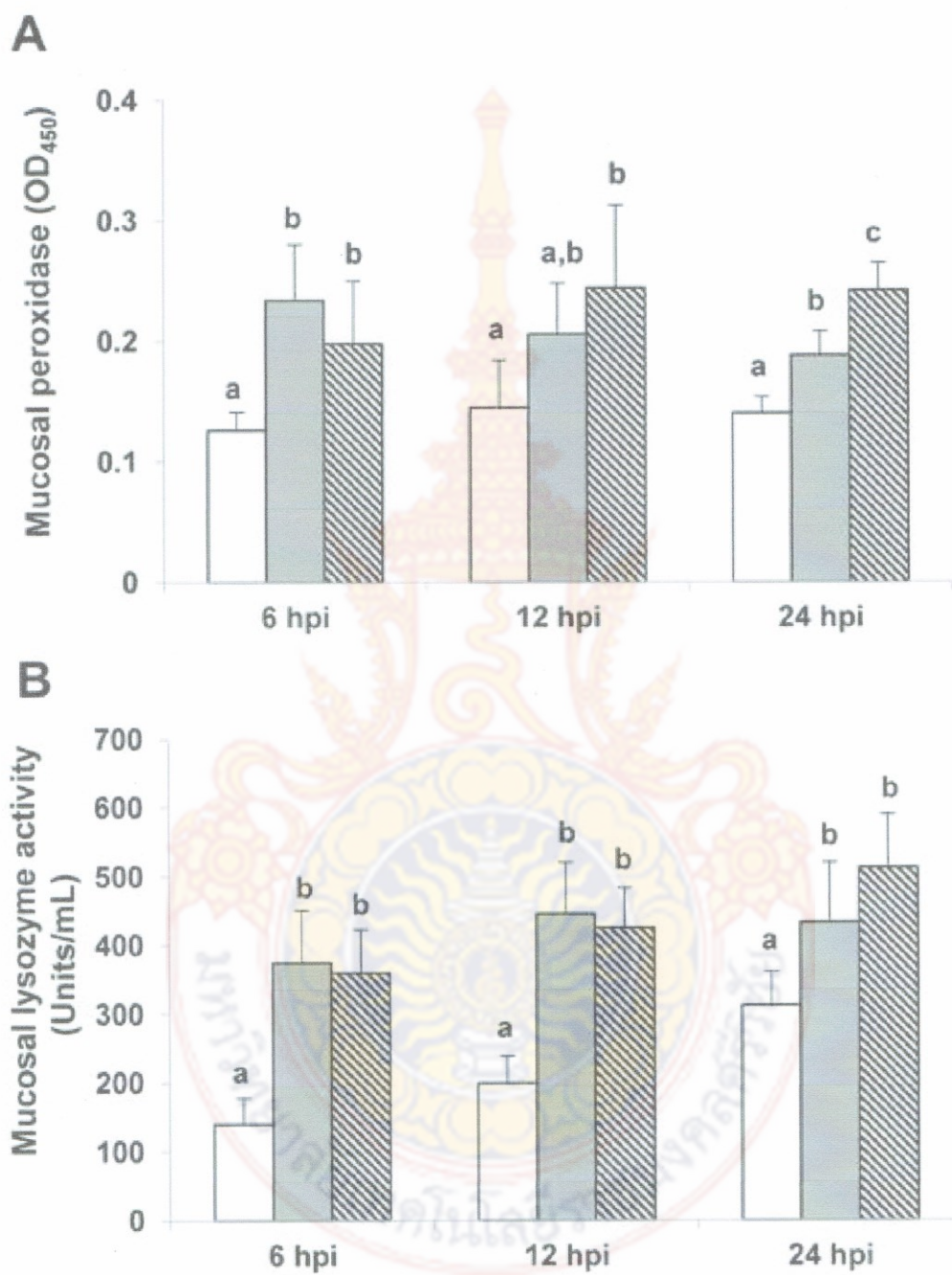
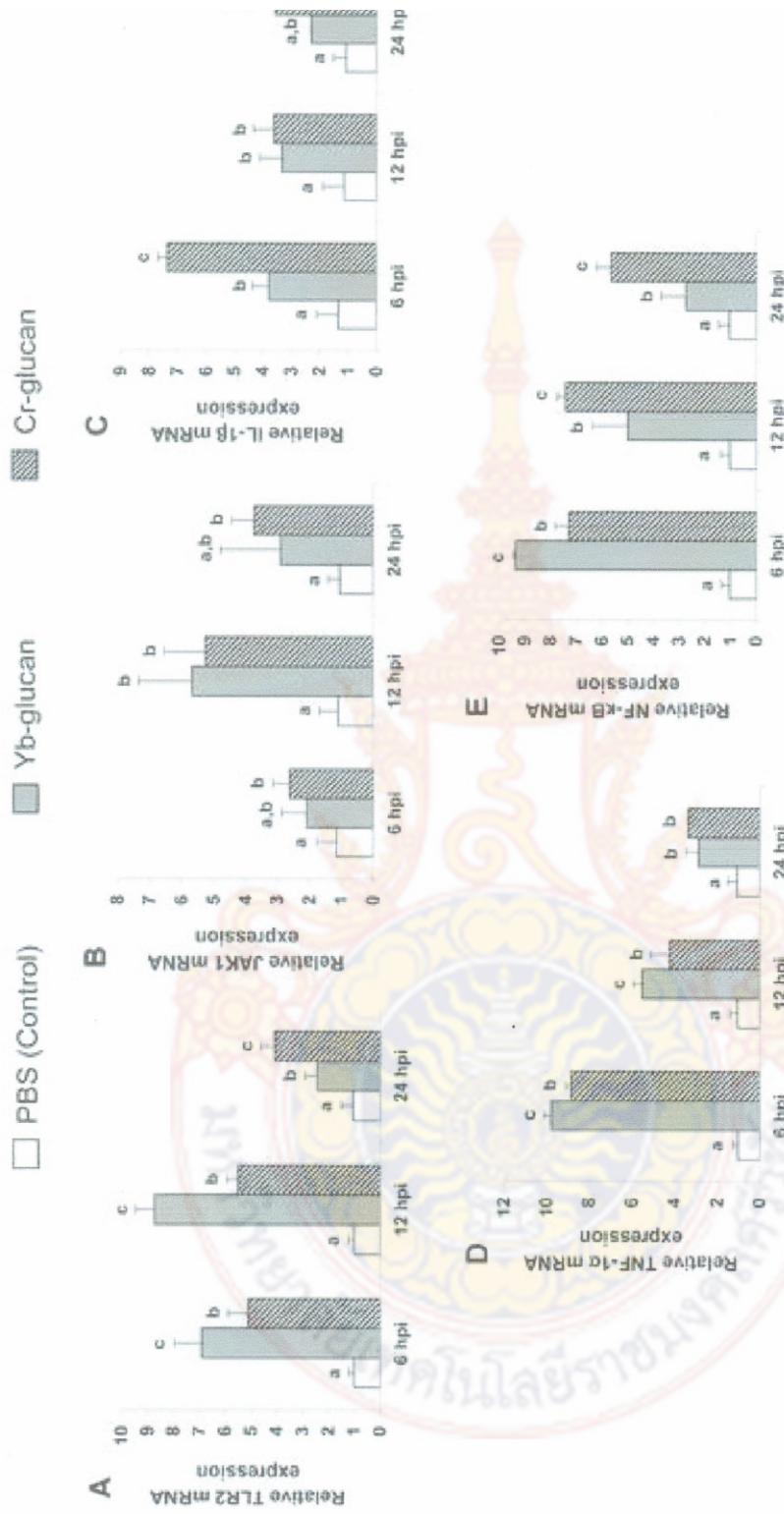




Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

□ PBS (Control)    ■ Yb-glucan    ▨ Cr-glucan





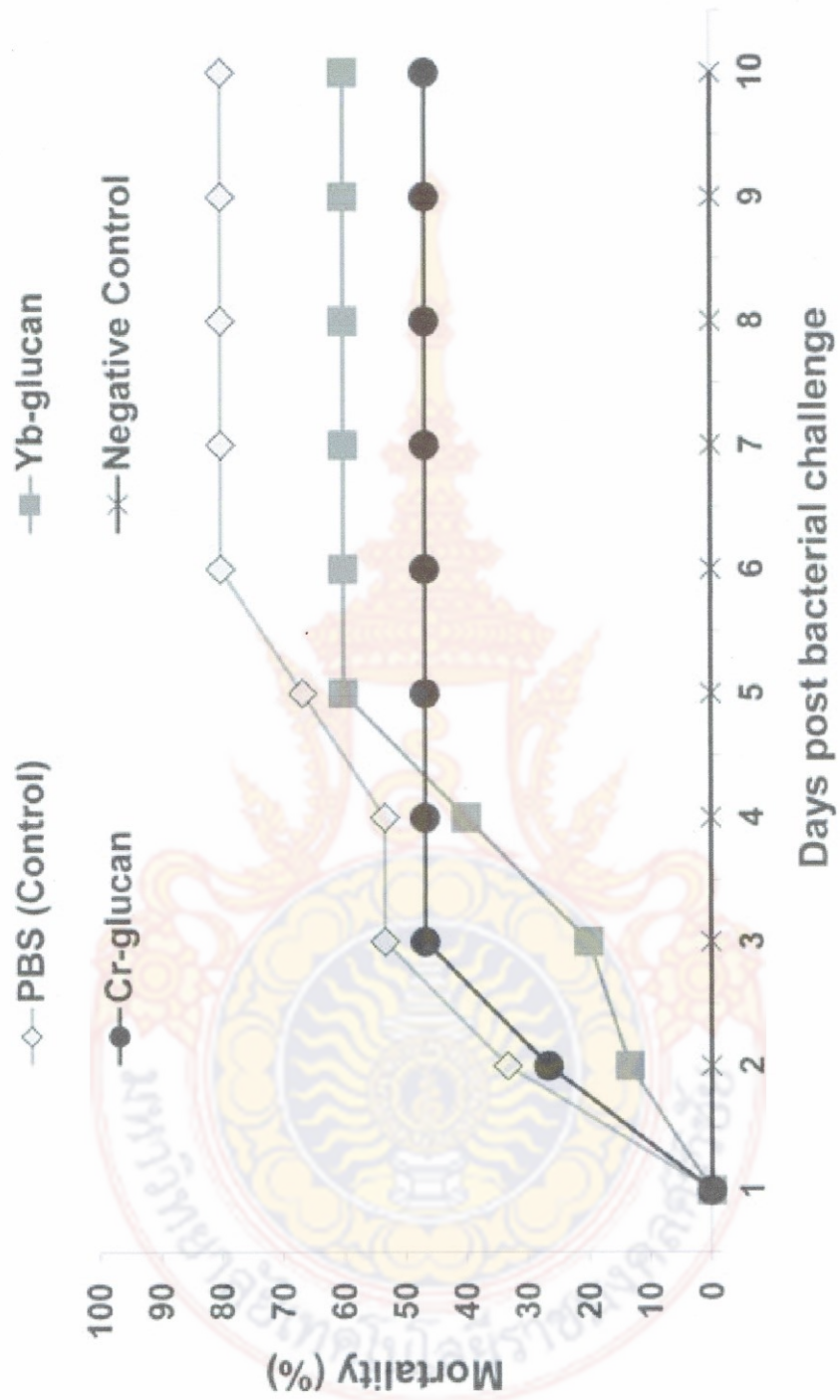


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)