ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus* spp.

วิทยานิพนธ์

ของ

ปรียารัตน์ โยวะผุย

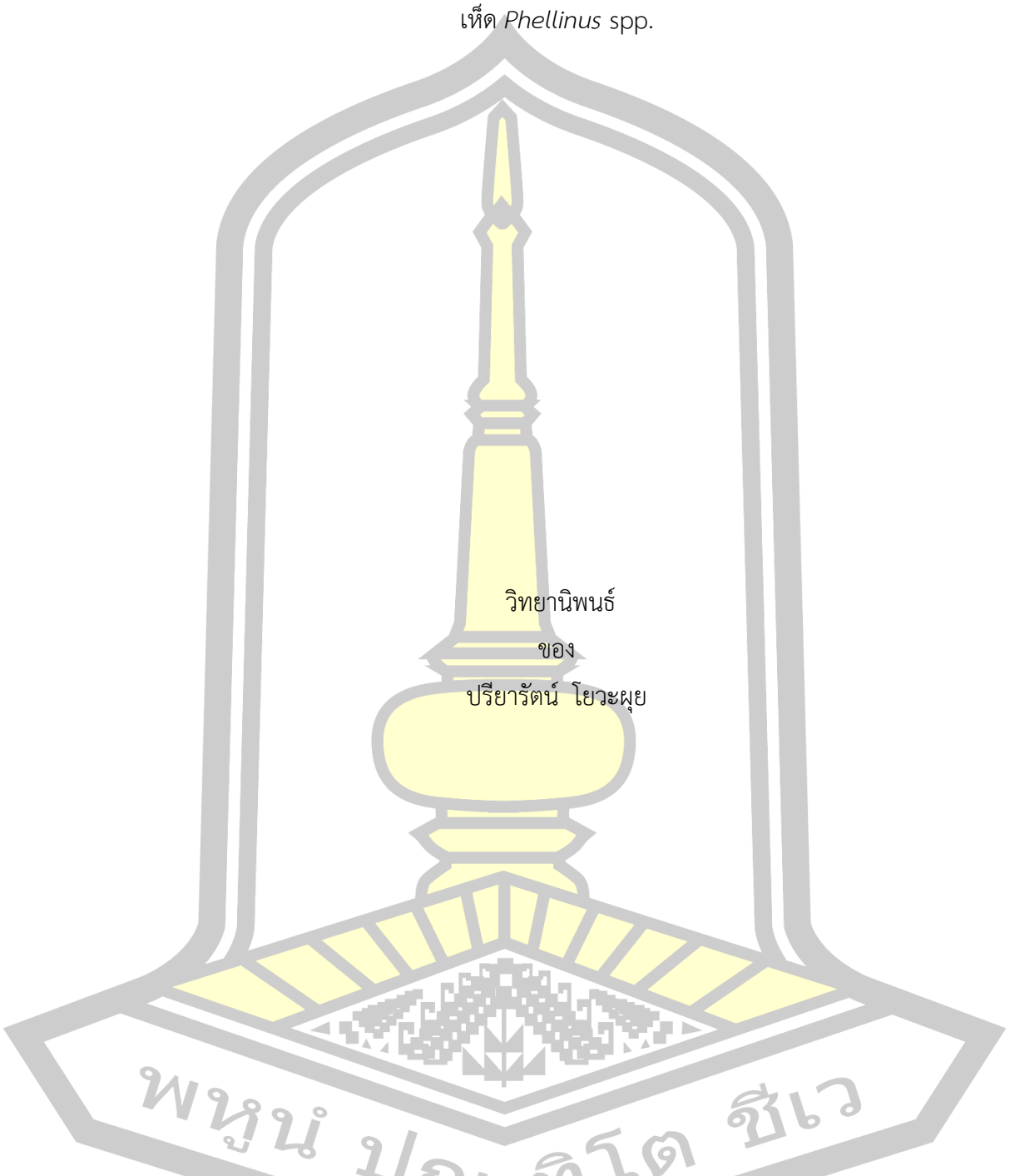
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

กันยายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus* spp.



วิทยานิพนธ์

ของ

ปรียารัตน์ โยวะผุย

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

กันยายน 2562

สงวนลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of *Phellinus* spp. crude polysaccharide extract

Preeyarat Yowaphui

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Doctor of Philosophy (Biology)

September 2019

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวปรียารัตน์ โยวะผุย แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. โสภณ บุญลือ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. วัชรา กาญจนรัช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. รักฤดี สารธิมา)

.....กรรมการ
(ดร. สุจิรา มณีรัตน์)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. ศรัณยู คำเมือง)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ชื่อเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus* spp.

ผู้วิจัย ปรียารัตน์ โยวะผุย

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรา กาญจนรัช

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รักฤดี สารธิมา

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต **สาขาวิชา** ชีววิทยา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ด *Phellinus* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS assay) และวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* ผลการวิจัยพบว่า เส้นใยเห็ด *P. igniarius P. nigricans* และ *P. robustus* เจริญได้ดีบนอาหาร GY2 สำหรับเส้นใย *P. setulosus* เจริญได้ดีบนอาหาร GY1 และ *P. igniarius P. nigricans* และ *P.robustus* ให้น้ำหนักแห้งเส้นใยมากที่สุด (11.32 ± 5.12 , 10.74 ± 3.99 และ 10.20 ± 4.04 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เส้นใย *P. igniarius* ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด (19.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบมากที่สุด (798.81 ± 26.30 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) พบปริมาณโปรตีนรวมรวมมากที่สุดในเส้นใยเห็ด *P. igniarius* (14.71 ± 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) เส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH สูงสุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 62.45 ± 0.96 และ 64.27 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 27.24 ± 0.76 และ 28.06 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลการตรวจสอบฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP ดีสุดคือ สารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *P. igniareus* (119 ± 1.63 ไมโครโมลเฟอรัสซัลเฟตต่อสารสกัดหยาบ) สำหรับปริมาณฟีนอลิกรวมพบปริมาณสูงสุดในสารสกัดหยาบเส้นใย *P. igniarius* (97.76 ± 2.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดในสารสกัดหยาบดอก *P. igniarius* (300.80 ± 1.17 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2

พบว่าเส้นใย *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ดีที่สุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 112.19 ± 11.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่ดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (ค่า IC_{50} เท่ากับ 1820 ± 0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าเส้นใย *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ได้ดีที่สุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 129.45 ± 32.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่ดอกเห็ด *P. igniarius* (ค่า IC_{50} เท่ากับ 1550 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโดยทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MICs) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration; MBCs) พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* สามารถยับยั้งและฆ่า *Proteus mirabilis* (TISTR 100) (MIC 25 และ MBC >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ดีที่สุด ดอกเห็ด *P. igniarius* สามารถยับยั้งและฆ่า *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933) (MIC 25 และ MBC >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ดีที่สุด และดอกเห็ด *P. igniarius* สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (TISTR518) (MIC 50 และ MBC >100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ดีที่สุด จากการระบุชนิดของเห็ดด้วยวิธีทางอณูวิทยาบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) พบว่า *Phellinus* 4 สายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* เท่ากับ 98.47, 99.72,99.21 และ 97.14 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้เป็นงานที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกันกับสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมได้

คำสำคัญ : Phellinus, พอลิแซ็กคาไรด์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์, ความเป็นพิษของเซลล์

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

TITLE Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of *Phellinus* spp. crude polysaccharide extract

AUTHOR Preeyarat Yowaphui

ADVISORS Assistant Professor Watchara Kanjanaruch , Ph.D.
Assistant Professor Rakrudee Sarnthima , Ph.D.

DEGREE Doctor of Philosophy **MAJOR** Biology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2019

ABSTRACT

This research purposes to determine the optimal medium for mycelium production of *Phellinus* with antioxidant activity by using method of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS assay) and Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) with antimicrobial activity and toxicity for living cells of polysaccharides crude extract from dried mycelia and fresh fruiting bodies of *Phellinus* mushrooms e.g. including *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* and *P. setulosus.* The findings revealed that the fiber from *P. igniarius*, *P. nigricans and P. robustus* grew well on medium GY2. The mycelium from *P. setulosus* grew well on medium GY1. *P. igniarius P. nigricans* and *P. robustus* produced the most mycelia dry weight (11.32 ± 5.12, 10.74 ± 3.99 and 10.20 ± 4.04 g/ l) , respectively. *P. igniarius* produced the most polysaccharides crude extract (19.05 mg/dry weight) and the most total polysaccharide was also found (798.81 ± 26.30 mg/g crude extract). The most total protein was found in mycelium from *P. igniarius* (14.71 ± 1.55 mg/g crude extract) . The crude extract of mycelium and fruiting bodies from *P. igniarius* has the highest antioxidant activity with the highest DPPH (value IC_{50} equals 62.45 ± 0.96 and 64.27 ± 0.18 µg/ml), respectively. Moreover, the antioxidant activity ABTS was also the highest (value IC_{50} equals 27.24 ± 0.76 and 28.06 ± 0.17 µg/ml), respectively. The result of metal reduction effect FRAP method was the crude extract of mycelium from *P. igniarius* (119 ± 1.63 µmole$FeSo_4$/dw). The amount of

total phenolic was found mostly in crude extract of mycelium from *P. igniarius* (97.76 ± 2.20 mg of gallic acid/dw) and the amount of total flavonoid was mostly found in crude extract of fruiting bodies from *P. igniarius* (300.80 ± 1.17 mg of quercetin/ dw) . The results of cytoxicity for liver cancer cell HepG2 value IC_{50} revealed high inhibition from *P. igniarius* mycelium (112.19 ± 11.40 mg/ml) and from *P. igniarius* fruiting bodies (1820 ± 0.11 mg/ml). The results of cytoxicity for breast cancer cell MDA-MB-231 revealed the value of IC_{50} was high inhibition from *P. igniarius* mycelium (129.45 ± 32.83 mg/ml) and from *P. igniarius* fruiting bodies (1550 ± 0.18 mg/ml). The antimicrobial activity of each extract was quantified by determining minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs). The crude extract of *P. igniarius* fruiting bodies inhibit was found to have strong activity against *Proteus mirabilis* (TISTR 100) (MIC 25 mg/ml; MBC >100 mg/ml) also the crude extract of *P. igniarius* and *P. nigricans* fruiting bodies inhibit against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933) (MIC 25 mg/ml; MBC >100 mg/ml) and *Staphylococcus epidermidis* (TISTR518) (MIC 50 mg/ml; MBC >100 mg/ml). In addition, *Phellinus* 4 isolates were identified as having 98.47, 99.72, 99.21 and 97.14% similarity to *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* and *P. setulosus*, respectively based on analysis of their internal transcribed spacer (ITS). This research is shows that the crude extract of polysaccharides from mycelium has bioactive substances close to the crude extract from fruiting bodies mushroom, which can be used as a drug and supplementary product.

Keyword : Phellinus, Polysaccharide, Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxicity

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนจากสนับสนุนโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจากผู้ช่วยศาสตร์ตราจารย์ ดร.วัชรา กาญจนรัช ประธานกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตร์ตราจารย์ ดร. รักฤดี สารธิมา กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ รองศาสตร์ตราจารย์ ดร.โสภณ บุญลือ ประธานกรรมการสอบ ผู้ทรงคุณวุฒิจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ช่วยศาสตร์ตราจารย์ ดร. ศรัณยู คำเมือง และอาจารย์ ดร.สุจิรา มณีรัตน์ กรรมการสอบ

ขอขอบพระคุณ สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณระคุณคณาจารย์ทุกท่าน บิดา และมารดาที่เคารพ ตลอดจนทุกท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยครั้งนี้ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาและทำวิจัยตลอดมาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ปรียารัตน์ โยวะผุย

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ภูมิหลัง 1

1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย 2

1.3 ความสำคัญของการวิจัย 2

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย 2

1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย 3

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ 5

บทที่ 2 ปริทัศน์เอกสารข้อมูล 6

2.1 นิยาม บทบาทของเห็ดและ *Phellinus* spp. 6

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด *Phellinus* spp. 9

2.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) 17

2.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) 24

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 29

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 34

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง 34

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 34
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 37
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ 38
3.5 ยาปฏิชีวนะ 38
3.6 วิธีการทดลอง 38
บทที่ 4 ผลการวิจัย 45
4.1 การจำแนกเห็ดโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม 45
4.2 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp. 46
4.3 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณน้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 49
4.3 วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ พอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 51
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ 56
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 75
5.1 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp. 75
5.2 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณ พอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 76
5.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 76
5.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ 77
บรรณานุกรม 81
ภาคผนวก 95
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมสารเคมี 96

ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน 100

ภาคผนวก ค รูปภาพแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด ภาพทดสอบหาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และแสดงภาพ phylogenetice tree..... 105

ประวัติผู้เขียน..... 109

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1.1 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 4

ตาราง 4.1 ผลการศึกษาค่าผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)..... 46

ตาราง 4.2 น้ำหนักแห้ง ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว 3 สูตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า 125 รอบต่อนาที และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน 48

ตาราง 4.3 น้ำหนักแห้งของเส้นใย ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์รวม ของเส้นใยเห็ด Phellinus จำนวน 4 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเหมาะสม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน 50

ตาราง 4.4 ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากดอกเห็ด Phellinus จำนวน 4 สายพันธุ์..... 51

ตาราง 4.5 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์..... 52

ตาราง 4.6 ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด Phellinus 4 สายพันธุ์ 53

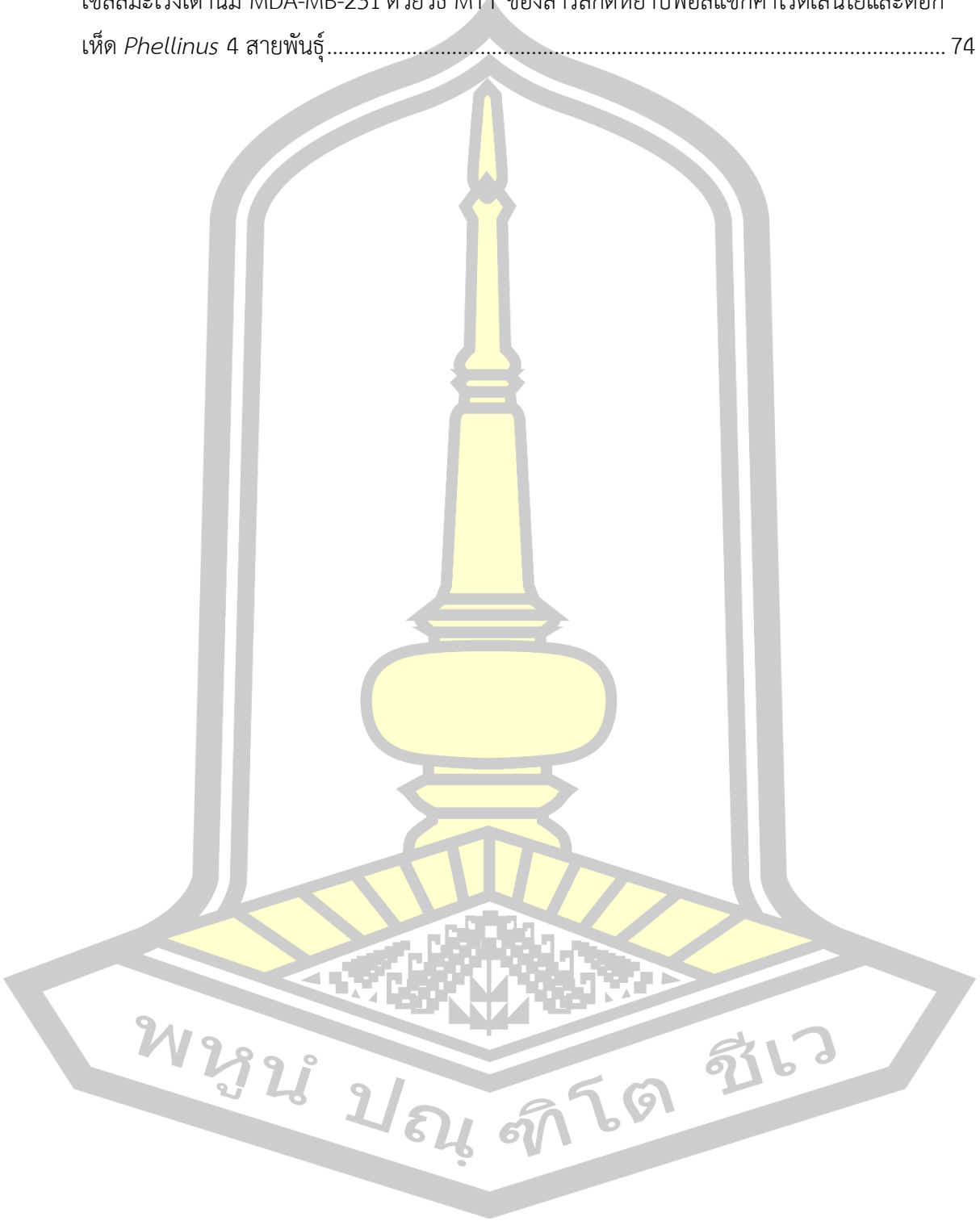
ตาราง 4.7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP จากสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 60

ตาราง 4.8 แสดงความสัมพันธ์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP กับปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจาก เส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp. 64

ตาราง 4.9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ด้วยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด Phellinus โดยวิธี Agar well diffusion 68

ตาราง 4.10 ความเขมขนต่ำสุดของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด Phellinus ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (MIC) และฤทธิ์ฆาเชื้อแบคทีเรียกอโรค ในมนุษย (MBC) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)..... 68

ตาราง 4.11 ผลการศึกษาค่า IC_{50} การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์ 74



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 4.1 FTIR Spectra ของเส้นใยเห็ด *P. igniarius, P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus* 55

ภาพประกอบ 4.2 FTIR Spectra ของดอกเห็ด *P. igniarius, P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus* 55

ภาพประกอบ 4.3 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) *Phellinus* spp. 59

ภาพประกอบ 4.4 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) *Phellinus* spp 60

ภาพประกอบ 4.5 แสดงผลจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (%) โดยวิธี MTT เซลล์มะเร็งตับ HepG2 จากสารสกัดหยาบเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) 72

ภาพประกอบ 4.6 แสดงผลจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (%) โดยวิธี MTT เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 จากสารสกัดหยาบเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) 73

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

เห็ดเป็นที่รู้จักมายาวนานในการนำมาใช้ทำอาหาร เป็นยารักษาโรค ในเห็ดจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ (Zhang *et al*., 2007) เห็ดและราเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อรา นักวิทยาศาสตร์ได้จัดให้อยู่ในอาณาจักรไมโคตา (Kingdom Mycota) เป็นอาณาจักรของสิ่งมีชีวิตที่แยกจากพืช สัตว์ และแบคทีเรีย เห็ดมีสิ่งที่น่าสนใจทั้งลักษณะ รสชาด กลิ่น เมื่อนำมาบริโภคดีต่อสุขภาพอีกทั้งมีองค์ประกอบด้านชีวเคมีประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เอนไซม์ แร่ธาตุ วิตามิน และน้ำ (Chang *et al*., 2008) สามารถแบ่งกลุ่มสารในเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ 2 กลุ่ม คือ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และไตรเทอปีน (Triperpene) (Ameri *et al*., 2011)

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบสำคัญในเห็ดกินได้ และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านเนื้องอก (anti-tomor), อิมมูนวิทยา (immunology), และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Stachowiak & Reguła, 2012) สามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ เช่น วิตามินเอ (A), วิตามินซี (C), วิตามินอี (E), คาโรทีนอยด์ (Carotenoids), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และสารประกอบฟีนอล (Phenol) (Mackerras, 1995) พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระพบในเห็ดและรารวมทั้ง *Ganoderma lucidum, Lentinula edodes, Grifola umbrellata, Schizophyllum commune* และ *Coriolus versicolor* (Kozarski *et al*., 2013; Wang *et al*., 2013) นอกจากนี้มีเห็ด *Phellinus* spp. เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาที่รู้จักกันเป็นระยะเวลานานหลายพันปี จัดอยู่ในวงศ์ (family) Hymenochaetaceae และอยู่ใน class (Basidiomycetes) (Yan *et al*., 2008) มีจำนวนหลากหลาย ยกตัวอย่าง เช่น *P. igniarius, P. hartigii, P. gilvus, P. pini* เป็นต้น เห็ด *Phellinus* สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต่างๆได้หลายชนิด เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) ไตรเทอพีนอยด์ (Triterpenoid) และโปรตีน หรือ เอนไซม์ (enzymes) ต่างๆ เป็นต้น ซึ่งสารต่างๆ ที่สกัดได้จากเห็ด *Phellinus* มีสมบัติที่ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื้องอก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น (Hsieh *et al*., 2013; Zhu *et al*., 2008)

เนื่องจากความสำคัญของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเห็ดจากที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด *Phellinus* ในอาหารเหลวที่เหมาะสม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และศึกษาลักษณะทางเคมีบางประการของพอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อนำไป

ประยุกต์ใช้เป็นยา ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และเป็นการลดการนำเข้าด้านเภสัชกรรม เวชภัณฑ์ จากต่างประเทศ

1.2 ความมุ่งหมายของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ด *Phellinus* และพอลิแซ็กคาไรด์

1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตของพอลิแซ็กคาไรด์ในเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus*

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

เพื่อศึกษาอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ด *Phellinus* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของพอลิแซ็กคาไรด์ในเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเป็นการลดการนำเข้าด้านเภสัชกรรม เวชภัณฑ์ จากต่างประเทศ

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการศึกษาอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ด *Phellinus* ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของพอลิแซ็กคาไรด์ในเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus*

1.4.1 ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารแข็งและอาหารเหลว

1.4.1.1 เห็ด *Phellinus* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus*

1.4.1.2 ชนิดของอาหารในการเพาะเลี้ยง 3 ชนิด คือ Potato Malt Peptone (PMP), Glucose Yeast Extract 1 (GY1) และ Glucose Yeast Extract 2 (GY2)

1.4.2 สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GY1 และ GY2

1.4.2.1 ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม และปริมาณโปรตีนในเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

1.4.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ

1.4.2.3 การเกิดความเป็นพิษในเซลล์สิ่งมีชีวิต

1.4.2.4 วิเคราะห์ FTIR

โดยมีปัจจัย ดังนี้

1) สภาวะการเลี้ยงเห็ดในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิ

2) ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเห็ด

1.5 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ทำการทดลองเดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2559 จนถึง ธันวาคม พ.ศ.2561 สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการอาคาร SC2 ห้อง 407/6 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

ตาราง 1.1 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย	เดือน, 2559											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. แผนการทดลอง							←	—	—	→		
2. หาข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง							←	—	—	→		
3. การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเห็ด การจัดจำแนกและการเตรียมหัวเชื้อเห็ด *Phellinus* spp.							←	—	—	—	—	→
4. ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.									←	—	—	→

ขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย	เดือน, 2560-2561											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5. การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์	←	—	—	→								
6. การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม	←	—	—	→								
7. การหาปริมาณโปรตีนรวม (Protein content)					←	—	→					
8. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ					←	—	—	→				
9. การหาปริมาณ Total phenolic content (TPC)								←	—	→		
10. การหาปริมาณ Total flavonoid content (TFC)								←	—	→		
11. ศึกษาผลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อการยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ก่อโรค			←	—	→							
12. ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration; MIC)			←	—	→							
13. ทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxic effect) ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต										←	—	→
14. FT-IR spectroscopy											←	→
15. การเขียนบทความวิจัยเพื่อการเขียนวิทยานิพนธ์ในการตีพิมพ์	←	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	→

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccaride) หมายถึง สารที่ประกอบด้วยกลูโคสตั้งแต่ 100,000 – 1,000,000 ล้านตัวขึ้นไป โมเลกุลขนาดใหญ่ มีโครงสร้างที่ซับซ้อน ประกอบไปด้วยพันธะ β-1,3 และ β-1,6 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 60 ของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในเห็ดกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นเบต้ากลูแคน โดยเบต้ากลูแคนที่พบจะเป็น β-1,3 และ β-1,6 มีผลปรับความดันโลหิต ลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด ป้องกันโรคภูมิแพ้ (Liu *et al.*, 2007)

2. Extracellular polysaccharide หมายถึง พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกขับออกนอกเส้นใยเห็ด

3. Intracellular polysaccharide หมายถึง พอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในเส้นใยเห็ด

4. พอลีฟีนอล (Polyphenol) หมายถึง โมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ฟีนอลมากกว่า 1 หมู่ เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบได้ทั่วไป สารกลุ่มฟีนอลได้แก่ กรดฟีนอลิก (phenolic acid), ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ไปจนถึงสารโครงสร้างพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน สารกลุ่มนี้นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีสมบัติอื่น เช่น กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ช่วยขยายหลอดเลือด ต้านโรคภูมิแพ้ และทำลายเชื้อโรคก่อนเข้าสู่ร่างกาย (Wu *et al*., 2012)

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 2
ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ประกอบด้วยหัวข้อดังต่อไปนี้

2.1 นิยาม บทบาทของเห็ดและ *Phellinus* spp.

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด *Phellinus* spp.

2.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

2.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นิยาม บทบาทของเห็ดและ *Phellinus* spp.

2.1.1 นิยาม บทบาทของเห็ด

เห็ดจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกราที่เส้นใยสามารถรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างหรือดอก (fruiting body) ขนาดใหญ่ มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีลักษณะของการมีเนื้ออ่อน นิ่ม หนัง หรือแข็งเหนียว หยิบจับสัมผัสได้สะดวก และส่วนภายในหรือบนดอกนี้เป็นที่เกิดของหน่วยสืบพันธุ์ (spore) ของเห็ด (อุทัยวรรณ แสงวณิช, 2542) มีหน่วยสืบพันธุ์หรือสปอร์แบบมีเพศ (sexual spore) ลักษณะขนาดเล็กมากต้องอาศัยตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีการเกิดของเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศของเห็ดมี 2 วิธี จึงทำให้มีการจัดแบ่งเห็ดออกเป็น 2 ไฟลัม (phylum) คือไฟลัม Ascomycota และ Basiodiomycota ในการศึกษาในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เห็ดในไฟลัม Basiodiomycota เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างเป็นดอกที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดและมีวิวัฒนาการสูงสุด ลักษณะทั่วไปเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้นตามขวาง (septate mycelium) และที่บริเวณผนังกั้นจะพบโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า clamp connection ยกเว้นในพวกราสนิม (rust) การสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือสปอร์แบบมีเพศของราไฟลัมนี้จะมีโครงสร้างที่มีชื่อเรียกว่า เบสิเดียม (basidium) ก่อน จากนั้นบน basidium นี้จึงจะเป็นที่เกิดของสปอร์แบบมีเพศ มีชื่อเฉพาะว่า basidiospore ส่วนการเจริญครบวัฏจักรชีวิตมักพบเส้นใย 3 ระยะด้วยกัน คือ เส้นใยปฐมภูมิ เส้นใยทุติยภูมิ และเส้นใยตติยภูมิ (Alexopoulos *et al*., 1996)

บทบาทของเห็ดนั้น สืบเนื่องมาจากเห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้จึงต้องอาศัยอาหารจากสิ่งที่เห็ดขึ้นอยู่เพื่อการเจริญ ทำให้มองสิ่งที่ให้อาหารแก่เห็ดสามารถบอกถึงบทบาทและหน้าที่ต่อระบบนิเวศของเห็ดได้ดังนี้ (อุทัยวรรณ แสงวณิช, 2542)

1. เห็ดที่ขึ้นอยู่บนเศษซากพืชและมูลสัตว์ เรียกว่า เห็ดผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุ (saprophytic mushroom) เห็ดจะทำหน้าที่ย่อยสลายซากเหล่านั้น โดยการปล่อยน้ำย่อยออกไปย่อยเนื้อไม้ ทำให้เนื้อไม้นั้นค่อยๆ ผุพัง และกลายเป็นแร่ธาตุ บางส่วนของแร่ธาตุจะถูกเส้นใยของเห็ดนำไปใช้
2. เห็ดที่ขึ้นโดยตรงจากดิน จะเจริญอยู่ใกล้ๆ กับรากพืชในแบบพึ่งพาอาศัยกัน หรือที่เรียกว่าเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizal mushroom) ส่วนของเส้นใยเจริญภายในรากพืชและกระจายอยู่ในดิน ทำหน้าที่ช่วยดูดแร่ธาตุและน้ำในดินส่งผ่านไปให้ต้นพืช ช่วยให้พืชเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น ทนทานต่อโรคที่จะเกิดกับราก และทนทานต่อความแห้งแล้งได้มากขึ้น
3. เห็ดที่ขึ้นอยู่ตามลำต้น กิ่ง และก้านของต้นไม้ บนตัวหนอนหรือส่วนต่างๆ ของแมลงที่ยังมีชีวิตอยู่ เรียกว่า เห็ดปรสิต (parasitic mushroom) เห็ดประเภทนี้จะเข้าไปแย่งน้ำและอาหารทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งที่เห็ดอาศัยอยู่จะค่อยๆ ตายไป อีกทั้งจากจุดเล็กๆ แล้วค่อยขยายออกไปจนพืชทั้งต้นหรือแมลงทั้งตัวถึงตาย

2.1.2 การจัดจำแนกเห็ด *Phellinus* spp. จำแนกได้ดังนี้

เห็ดในสกุล *Phellinus* ชั้น Basidiomycetes อันดับ Hymenochaetales จัดอยู่ในวงศ์ Hymenochataceae (Yan *et al*., 2016)

Kingdom : Fungi

Phylum : Basidiomycota

Class : Basidiomycetes

Order : Hymenochaetales

Family : Hymenochataceae

Genus : *Phellinus* (Quelet, 1886)

เห็ดในสกุล *Phellinus* นี้มีความสำคัญทางการแพทย์ และยังเป็นปรสิตและเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับไม้ยืนต้น เห็ดนี้มีการกระจายตัวในป่าดิบแล้งทั้งทางตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย

(Nakamura *et al*., 2000) และยังพบว่าเป็นปรสิตของไม้เนื้อแข็งยืนต้น และทำหน้าที่ย่อยสลายขอนไม้ผุเป็นการหมุนเวียนธาตุอาหารกลับคืนสู่ธรรมชาติ (Kim *et al*., 1999)

2.1.3 ลักษณะของเห็ด *Phellinus* spp.

เห็ด *Phellinus* spp. เป็นที่สนใจและนำมาใช้แพร่หลายในทางการแพทย์ของจีน (Ye *et al*., 2007) พบสารสกัดจาก fruiting bodies มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kim *et al*., 2006) และยังพบว่าสามารถผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์จากน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ด (Zou *et al*., 2009) มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ *P. linteus, P. igniarius, P. hartigii, P. gilvus, P. pini* เป็นต้น (Ayer *et al*., 1996; Jung *et al*., 1997; Rew *et al*., 2000) เห็ด *Phellinus* จัดอยู่ใน Class Basidiomycetes เป็นเห็ดกลุ่ม polypore มีการสร้างสปอร์บนเนื้อเยื่อไฮมีเนียม (hymenium) บริเวณรูด้านใต้ โดยทั่วไปจะพบเห็ดราเจริญเติบโตตามลำต้นพืช บางชนิดก็เป็นราเบียน เรียกว่า wood rot เห็ดกลุ่มนี้มีความแข็งเหมือนกับซากไม้ที่ใช้เกาะอยู่ ทำให้มีลักษณะคล้ายไม้และอยู่ทนทานมาก เห็ด *Phellinus* จัดอยู่ในกลุ่มเห็ดหิ้ง (shelf fungi) ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายพัด มีสีน้ำตาลปนดำหรือน้ำตาลแดง ผิวดอกมีลักษณะเป็นวงคล้ายวงปีในเนื้อไม้ เรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ จากบริเวณกลางดอกจนถึงขอบดอก เหนียว ขรุขระเป็นคลื่นเว้านูนสลับกัน ใต้ครีบมีลักษณะเป็นรูรูปวงกลมขนาดเล็ก มีจำนวนมากเต็มทั่วใต้หมวกดอก มีความแข็งกระด้าง ยากต่อการขบเคี้ยวจึงไม่นิยมนำเป็นอาหาร แต่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ด้านยาสมุนไพรโบราณ อีกทั้งเห็ดในสกุล *Phellinus* มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ทั้งลักษณะของเส้นใย สปอร์ และเบสิเดียม (Nakamura *et al*., 2000)

2.1.4 ชีววิทยาของเห็ด *Phellinus*

เห็ด *Phellinus* มีบทบาทสำคัญในการย่อยอินทรียสาร เป็นปรสิตกับต้นไม้ ซึ่งเป็นการหมุนเวียนในระบบนิเวศ มีลักษณะแตกต่างจากเห็ดที่เราพบกันทั่วๆ ไป เพราะดอกไม่มีก้าน ดอกที่เกิดใหม่จะอยู่ทางด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่าดอกเก่า เกิดการเชื่อมกันติดเป็นเนื้อเดียวกันจนทำให้ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่และหนาขึ้นเรื่อยๆ ผิวของหมวกเห็ดเป็นสีน้ำตาลและเมื่อเวลาผ่านไปผิวของหมวกเห็ดก็จะกลายเป็นสีดำ สปอร์ของเห็ดมีผิวเรียบ ผนังหนา เกิดอยู่ในรูเล็กที่ซ้อนกันในเนื้อเห็ด มีสีน้ำตาลแดง ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีลักษณะแข็งกระด้างยากต่อการขบเคี้ยวจึงไม่นิยมนำมาใช้เป็นอาหาร แต่นิยมนำมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรโบราณ (วินัยและอุษา, 2548) ชาวอินเดียได้นำเห็ด *Phellinus* ทั้งหมด 12 สายพันธุ์มาใช้เป็นยาแผนโบราณ โดย *P. nigricans* ได้ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณในไซบีเรีย นอกจากนั้นยังมีชาวรัสเซียมีความเชื่อว่าเห็ดสายพันธุ์ *Phellinus* มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (Jeong *et al*., 2005)

2.1.5 นิเวศวิทยาของเห็ด *Phellinus*

เห็ด *Phellinus* มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศเนื่องจากช่วยย่อยสลายอินทรียสารต่างๆ รวมไปถึงสามารถปล่อยเอนไซม์ย่อยลิกนินภายในเนื้อไม้ บางสายพันธุ์มีบทบาทย่อยสลายซากสัตว์ซึ่งเป็นการหมุนเวียนธาตุอาหารกลับสู่ธรรมชาติ สามารถพบเห็ดสายพันธุ์นี้ในเขตป่าดิบแล้ง เกิดดอกเดี่ยว หรืออาจเกิดเป็นกลุ่มจำนวนมากเรียงซ้อนกันบนขอนไม้ผุ หรืออาจพบเป็นปรสิตกับไม้ยืนต้น ความหลากหลายของเห็ดนี้มีการกระจายอยู่ทั่วโลก รวมถึงภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในแถบบริเวณประเทศไทยและรอยต่อประเทศไทย และกัมพูชา อีกทั้งยังพบว่าความอุดมสมบูรณ์สูง เนื่องจากมีป่าไม้และต้นไม้ขนาดใหญ่เป็นจำนวนมากทำให้สามารถพบเห็ด *Phellinus* เช่นกัน (Nakamura *et al*., 2000)

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด *Phellinus* spp.

2.2.1 พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ด *Phellinus* spp. พบส่วนใหญ่เป็น เบต้ากลูแคน (β-glucan) ส่วนน้อยจะเป็นแอลฟากลูแคน (α-glucan) โดยเบต้ากลูแคนที่พบมักจะเป็น 1-3, 1-6 เบต้ากลูแคนจะมีผลต่อการหลั่งของ Nk cell, T cell, B cell และแมคโครฟาจแตกต่างกัน ทำให้เกิดการทำลายเซลล์มะเร็งทางอ้อม ดังการทดลองหาโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *P. ribis* โดยสกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 4 ครั้ง พบ β-D–glucan (1,4), (1,6)-linked backbone และ (1,3)-linkage ในระบบของสิ่งมีชีวิตจะเกี่ยวข้องกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ด้าน ได้แก่ ใช้เป็นอาหาร และเป็นโครงสร้างของเซลล์ ในกรณีของอาหารจำพวกแป้งนั้นจะเป็นหน่วยย่อยของกลูโคไพราโนส (glucopyranose) อะไมโลส (amylose) จัดเป็นสารชีวโมเลกุลที่โครงสร้างแบบเส้นตรง ประกอบด้วยกลูโคไพราโนส 1000-2000 หน่วย ซึ่งต่อกันแบบ α-1,4 ส่วนอะไมโลเพคติน (amylopectin) โมเลกุลจะยาวกว่าแต่ก็ไม่เกิน 10^6 หน่วยกลูโคไพราโนส แต่โครงสร้างจะเป็นกิ่งก้านคล้ายต้นไม้ (tree like structure) ซึ่งลักษณะส่วนที่เป็นแกนเส้นตรง 20 หน่วยต่อแบบ α-1,4 แล้วจึงมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อกันแบบ α-1,6 (Liu *et al*., 2007)

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นส่วนประกอบของสิ่งมีชีวิต ประกอบขึ้นด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุล เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเห็ดแต่ละชนิดอาจมีโครงสร้างแบบง่ายที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงหนึ่งชนิดหรือหลายชนิด จึงทำให้เกิดโครงสร้าง ที่ซับซ้อนและอาจมีโครงสร้างเป็นสายตรงหรือมีแขนงได้ นอกจากนี้พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ดกินได้ส่วนใหญ่เป็น เบต้ากลูแคน ซึ่งมีการวิจัยกันมากที่สุดในเห็ดหลินจือ เห็ดกระดุม และเห็ดหอม มี

รายงานว่า β-1,3–glucan และเฮทเทอโรพอลิแซกคาไรด์จากเห็ดเข็มทองมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก และยังพบว่าสารที่ให้ฤทธิ์นี้ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่รวมกับโปรตีน ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์นั้นประกอบขึ้นจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนส (Smiderle *et al*., 2006; Su *et al*, 2016)

2.2.1.1 ประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ จำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ตามมอนอแซ็กไรด์ที่เป็นองค์ประกอบได้ 2 ประเภท ดังนี้ (ศุภชัย สมัปปิโต, 2541)

1) โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียว เช่น เบต้ากลูแคน ที่ปกติจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสสายตรงหรือมีแขนง ซึ่งโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์มีโมเลกุลน้ำตาลเพียงชนิดเดียว และสังเคราะห์ขึ้นโดยเอนไซม์ตัวเดียว

2) เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เช่น Arabinoglucan (กลูแคนกับอะราบิโนส), Riboglucan (กลูแคนกับไรโบส), Xylomannan (แมนโนสกับไซโลส) ประกอบด้วยน้ำตาลและโมเลกุลอื่นๆ หลายชนิด และในกระบวนการสังเคราะห์จะต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด

2.2.1.2 จำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ตามลักษณะการผลิตได้ 2 ประเภท คือ

1) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular polysaccharides) การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์แบ่งออกได้ 2 ลักษณะดังนี้ ในรูปแบบของแคปซูล เรียกว่า capsular polysaccharides ซึ่งจะเกาะที่ผิวของเซลล์อย่างเหนียวแน่น และในรูปแบบของเมือก เรียกว่า slime polysaccharides ซึ่งจะเกาะที่ผิวเซลล์อย่างหลวมๆ แต่แยกความแตกต่างของพอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 2 แบบนี้ได้ยาก เนื่องจากแคปซูลเป็นจำนวนมากจะมีลักษณะคล้ายพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในรูปเมือก แบคทีเรียที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ *Xanthomonas campestris* ผลิต Xanthan gum (Sharma *et al.,* 2006) เชื้อราที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้แก่ *Pholiota adiposa* SX-02 (Deng *et al*., 2010), *Boletus speciosus Forest* (Ding *et al*., 2012) และ *Tricholoma matsutake* (Ding *et al.,* 2010) ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์นั้นจะมีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์เอง เช่น ป้องกันเซลล์จากความแห้งแล้งและสารพิษ

2) พอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular polysaccharides) พบในเห็ดหลายชนิด ได้แก่ *Phellinus nigricans* (Wang *et al*., 2014), *Antrodia camphorate* (Shu & Lung, 2008) เป็นต้น

การสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ที่จำแนกตามองค์ประกอบของมอนอแซ็กคาไรด์ กลไกการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่จะเกี่ยวกับการเติมโมเลกุลของมอนอเมอร์เดี่ยวๆ ลงไปที่ปลายของ non-reducing end เกิดเป็นโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นไพรเมอร์ ซึ่งในการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์อาจจะสังเคราะห์จากน้ำตาลที่เป็นชนิดมอโนแซ็กคาไรด์ และไดแซ็กคาไรด์ กลไกการสังเคราะห์เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์มีเอนไซม์เฉพาะหลายๆ ชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง กลไกการสังเคราะห์ มี 4 ขั้นตอน ดังนี้ การดูดซึมซับสเตรท (substrate uptake), การเกิดเมทาบอลิซึม (intermediary metabolism), การเกิดพอลิแซ็กคาไรด์ (formation of extracellular polysaccharide) และเกิดการเปลี่ยนแปลงและขับออกนอกเซลล์ (modification and extrusion) (ศุภชัย สมัปปิโต, 2541)

จากศึกษาลักษณะทางเคมีและฤทธิ์ทางยาของ fruiting body เห็ด *P. linteus* (Berkely & Curtis) และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วิเคราะห์หาองค์ประกอบ hydrophilic, phenolic acid, trocopherols และ ergosterol โดยใช้ HPLC และวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี reducing power, DPPH, inhibition of β-carotene และ thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี microdilution และต้านราวิธี dilution technique ทดสอบความเป็นพิษด้วย SRB assay พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ด *P. linteus* (Berkely & Curtis) ได้แก่ polysaccharide, glucans และ triterpenoid สารที่ใช้สกัดที่นิยมใช้ คือ เมทานอล (methanol) และเอทานอล (ethanol) ผลพบว่าสารสกัดเมทานอลจาก fruiting body แห้งของเห็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและแบคทีเรียได้ดีที่สุด ขณะที่ glucan และ triterpenoid มีฤทธิ์ต่อต้านราได้ดีที่สุด ในทางตรงกันข้ามการสกัดด้วยเอทานอล ให้การทดสอบความเป็นพิษได้ดีที่สุด (Reis *et al*., 2014)

2.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่ในออบิทอล (orbitals) วงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง หมายถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชั่น (transition) ส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเลคตรอนจำนวน 2 อิเลคตรอน แต่ละอิเลคตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเลคตรอนเดี่ยวในแต่ละออบิทอล ทั้งนี้การสปินหรือการหมุนรอบตัวของอิเลคตรอนทั้งสองจะสปิน (spin) แบบคู่ขนานในทิศทางเดียวกัน อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลอิสระในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูล หรืออนุมูลอิสระ คือ อิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\bullet}$, อนุมูล $A^{\bullet-}$ และอนุมูล $A^{\bullet+}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยา

มากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเลคตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะคือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ยกตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{\bullet-}$), อนุมูลไฮดรอกซี ($OH^{\bullet}$), อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$), อนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($OH_2^{\bullet}$) อนุมูลอิสระที่กล่าวมานี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก และมีไนตริกออกไซด์ (NO), อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซี เป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา (Leda *et al*., 2018) อนุมูลอิสระเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอสิระได้ภายในเซลล์ร่างกาย นำมาสู่ผลทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย ต้อกระจกและอาจก่อให้เกิดโรคอื่นๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลายจะทำให้เกิดโรคหัวใจในที่สุด แต่ถ้าเรารับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอสารนี้จะเข้าไปป้องกันหรือแย่งจับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย (Wang *et al*., 2014)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Reactive Oxygen Species; ROS) ด้วยเหตุที่ ROS เกิดขึ้นมาจากกระบวนการต่างๆ ในการดำรงชีวิต ดังนั้นร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น co-enzyme Q10 alpha-lipoic acid เป็นต้น โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนดึกติดต่อกันนานๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่างๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น เป็นต้นเหตุของภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson เกิดอาการอักเสบต่างๆ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติได้แก่ ป้องกันการเกิดขึ้นของ ROS ได้ สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่างๆ ต้องไม่เพิ่มความแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่ำไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูงเช่นไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ และเพิ่มการ

แสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (Manson, 2011)

การศึกษาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *P. durissimus* ด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน คือ เมทานอลนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, superoxide radical scavenging activity, erythrocyte membrane stabilizing activity, hydroxyl radical scavenging activity, liver lipid peroxidation assay, nitric oxide scavenging activity และ linoleic acid-ferric thiocynate method จากการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นพบสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ สเตอรอยด์ เทอราพรีน และแอนทราควิโนน เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสารสกัดต่างๆ พบว่า สารสกัดเมทานอลจาก *P. durissimus* มีฤทธิ์ต้านที่สุดคือ hydroxyl radical scavenging activity ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ linoleic acid-ferric thiocynate method, superoxide radical scavenging activity, nitric oxide scavenging activity และ erythrocyte membrane stabilizing activity ตามลำดับ (Li *et al*., 2008)

2.2.3 สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

สารกลุ่มนี้นอกจากจะสามารถต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีคุณสมบัติอื่น เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต้านมะเร็ง ต้านโรคภูมิแพ้ และทำลายเชื้อโรคก่อนเข้าสู่ร่างกาย จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของฟีนอลิกที่มีผลยับยั้ง NF-k8 จาก *P. baumii* ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทนอล แล้วนำมาแยก HPLC พบสาระสำคัญ 9 ชนิด โดยเป็นกลุ่มพอลีฟีนอลและสารประกอบฟีนอลิก (Wu *et al*., 2011)

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบินจะกำจัดอนุมูล (radical scavenger) ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบต้าแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุด นอกจากนี้ยังมีเกณฑ์ที่สำคัญอื่นๆ ที่ใช้บ่งชี้ถึงความเป็นสารต้านอนุมูลที่ดีได้แก่ ความสามารถในการถูกดูดซึมหรือส่งผ่านเข้าสู่เซลล์ทั้งภายในเซลล์ ภายนอกเซลล์ และที่เนื้อเยื่อต่างๆ สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ (Ferreira *et al*., 2009) ได้แก่

2.2.3.1 สารพอลีฟีนอล (Polyphenol)

เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีลักษณะเฉพาะ คือ ในโมเลกุลของสารพอลิฟีนอลจะมีหมู่ฟีนอลมากกว่า 1 หมู่ สารในกลุ่มโพลิฟีนอล แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

1) สารโครงสร้างที่มีโมเลกุลไม่ซับซ้อน เช่น phytic acid, ferulic acid, ellagic acid, cinnamic acid และ vanillin ซึ่งในกลุ่มของกรดฟีนอลิกและเอสเทอร์ของกรดฟี

นอลิกจะขึ้นกับจำนวนหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลมีคุณสมบัติในการดึงอิเลคตรอนของหมู่คาร์บอกซิลิกในกรดเบนโซอิก จะส่งผลให้ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของไฮดรอกซิลเบนโซเอทน้อยลง

2) ฟลาโวนอยด์ ในธรรมชาติมีโครงสร้างอยู่ในรูปอะไกลโคน อิสระหรือจับกับน้ำตาลเป็น glycoside ซึ่งมีโครงสร้างต่างจากโครงสร้างของวิตามินฟลาโวนอยด์แบ่งออก 2 กลุ่ม ได้แก่ anthocyanin และ anthoxantins

3) สารที่มีโครงสร้างพอลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน แทนนิน เพกติน และสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟีนอลิก โปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์

ในธรรมชาติฟลาโวนอยด์อยู่ในรูปของไกลโคไซด์คือ อะไกลโคนจับกับน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลอาจจับกับอะไกลโคน ตรงคาร์บอนที่โครงสร้างหลักเรียกว่า C-glycoside หรือ จับกับออกซิเจนที่เป็นกลุ่มอะตอมของ OH ทำให้จุดเชื่อมต่อ คือ ออกซิเจน จึงเรียกว่า O-glycoside การจับของน้ำตาลกับ ฟลาโวนอยด์จะเป็นแบบ α-linkage (น้ำตาลในแป้ง จับกันแบบ β-linkage) คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอไกลโคนและไกลโคไซด์มีผลต่อการดูดซึมของฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin 3′- glucoside ถูกดูดซึมได้ในลำไส้เล็กตั้งแต่ดูโอดีนัม เป็นต้นไป แต่ quercetin 3′- galactoside กลับไม่สามารถ ดูดซึมได้ที่บริเวณเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจาก glucoside ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็นอะไกลโคน แล้วถูกดูดซึม แต่ galactoside ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ (Chang *et al*., 2005) การดูดซึมจะต้องผ่านกระบวนการละลาย การดูดซึม มี 3 วิธีคือ

1) การซึมผ่านเข้าเซลล์ (transcellular diffusion) โดยอาศัยคุณสมบัติการละลายที่เหมือนกับผนังเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เป็นไขมัน

2) การดูดซึมผ่านเข้าระหว่างเซลล์ (paracellular diffusion) ของสารที่เป็น hydrophilic

3) การดูดซึมแบบมีตัวนำส่งที่เรียกว่า active transport โดยมีตัวนำส่ง (transporters) อยู่ที่ apical membrane ของเซลล์ผนัง ด้านในของอวัยวะเช่น organic anion /cation transporters ซึ่งทั้งหมดนี้ขึ้นอยู่กับสมบัติของฟลาโวนอยด์ว่าจะจับกับ transporter ได้หรือไม่ นอกจากจะมีการนำส่งสารเข้าเซลล์แล้ว ที่ผนังเซลล์เหล่านี้ก็จะมีตัวนำส่งออก (efflux transporters) ซึ่งไม่ยอมให้สารผ่านเข้าเซลล์แต่จะนำสารออกจากเซลล์ เช่น P-glycoprotein (P-gp), multidrug-resistance associated protein (MRP), breast cancer resistance protein (BCRP) ซึ่งมีส่วนทำให้ฟลาโวนอยด์ถูกดูดซึมได้น้อย (Walle, 2004) การที่ฟลาโวนอยด์ทำปฏิกิริยาจับกับตัวนำส่งเหล่านี้มีจะผลต่อการดูดซึมของสารอื่นๆ ด้วย เช่น หากมีการรับประทานยาที่ทำปฏิกิริยากับตัวนำส่งตัวเดียวกันกับฟลาโวนอยด์ เมื่อตัวนำส่งถูกจับด้วยฟลาโวนอยด์ยาจะอยู่ในร่างกายได้มากกว่าที่ควรจะ

เป็นและมีความเข้มข้นสูงเกิน ระดับที่ใช้ในการรักษา และหากเป็นยาที่ช่วงการรักษาและ การเป็นพิษอยู่ใกล้กัน (narrow therapeutic range) ก็จะก่อให้เกิดพิษได้ (Alverez, 2010)

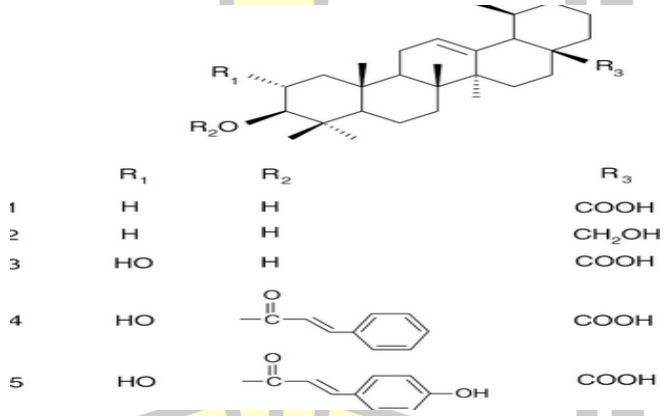
สารประกอบฟลาโวนอยด์อาจเรียกได้ว่าเป็นสารอาหารที่ใช้เป็นยา (nutraceutical) ซึ่งหมายถึงอาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำมาใช้เป็นยาหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งในด้านการป้องกันและการรักษาโรค โดยมีประโยชน์ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ แชลโคนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ซึ่งกระจายทั่วไปในอาณาจักรพืช เมื่อหมู่ไฮดรอกซีของส่วนบนเบนโซอิลเกิดปฏิกิริยาจะได้นาริจีนินซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ประเภทฟลาวาโนน (flavanone) มีข้อสังเกตว่าหากอยู่ในสภาวะกรด สารนี้จะอยู่ในรูปของฟลาวาโนน ในทางตรงกันข้ามถ้าสภาวะเป็นเบสก็จะไอโซเมอไรซ์กลายเป็นแชลโคน อย่างไรก็ตามในธรรมชาติเอนไซม์จะเป็นตัวกำหนดให้สารนี้เกิดขึ้นเพียงเอแนนทิโอเมอร์เดียวเท่านั้น โครงสร้างฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่หมู่ไฮดรอกซีหายไป 1 หมู่ เช่น สารลิกควิจิทิจีนิน (liquiritigenin) ซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์หมู่คีโทนของสายโซ่พอลิคีไทด์เป็นแอลกอฮอล์ก่อนเกิดปฏิกิริยาไคเซน ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงนี้แสดงให้เห็นถึงการทำหน้าที่คู่กันระหว่างเอนไซม์ รีดักเทส (reductase enzyme) กับเอนไซม์สังเคราะห์แชลโคน ซึ่งพบว่าไอโซลิกควิทริจีนินจะเกิดได้ง่ายกว่านารินจีนิน สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงซี ซึ่งเป็นวงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุล (Wang *et al.,* 2010)

2.2.3.2 สารไตรเทอร์พีนส์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenes or Triterpenoids)

ซึ่งมีสารประกอบนับร้อยชนิด แต่ที่มีความสำคัญ คือ สารกลุ่ม กาโนเดอริคแอซิด (Ganoderic acid) คุณสมบัติช่วยลดการอักเสบของตับ เสริมสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ช่วยขจัดสารพิษออกจากตับ ช่วยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ขัดขวางการลำเลียงเลือดไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งอีกด้วย (Ameri *et al*., 2011)

เทอร์พีนอยด์เป็นกลุ่มสารที่พบมากในธรรมชาติและมีโครงสร้างค่อนข้างหลากหลาย ทั้งนี้พัฒนามาจาก C_5 ของหน่วยไอโซพรีนโดยการสร้างพันธะระหว่างกันแบบหัวต่อหาง (head to tail fashion) ดังนั้นโครงสร้างโดยทั่วไปจึงประกอบด้วย $(C_5)_n$ ซึ่งแบ่งออกเป็นดังนี้ เฮมิเทอร์พีน (hemiterpene, C_5), มอนอเทอร์พีน (monoterpene, C_{10}), เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpene, C_{15}), ไดเทอร์พีน (diterpene, C_{20}), เซสเทอร์เทอร์พีน (sesterterpene, C_{25}), ไทรเทอร์พีน (triterpene, C_{30}) และ เททระเทอร์พีน (tetrapene, C_{40}) ตัวอย่างโครงสร้างเทอพีนอยด์ดังภาพประกอบ 2.1 และความสำคัญเทอร์พีนอยนั้น สำหรับหน่วยไอโซพรีนไม่อาจระบุรายละเอียดอย่างอิสระได้ จึงต้องประกอบเป็นโครงสร้างของเทอร์พีนอยด์กลุ่มต่างๆ ดังนั้นอาจเรียกสารเหล่านั้นว่า ไอโซพรีนนอยด์ (isoprenoid) ในทางชีวเคมีพบว่าสารที่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา

เคมีได้แก่ ไดเมทิลแอลลิล ไดฟอสเฟต (dimethylallyl diphosphate, DMAPP) และไอโซเพนทีนิล ไดฟอสเฟต (isopentenyl diphosphate, IPP) นอกจากนั้นในการสร้างพันธะของหน่วยไอโซพรีนยังคงต้องต่อกันแบบหัวหาง ในสารประกอบ เช่น เจอรานิออล (geraniol), ฟาร์นีซอล (fanesol), เจอรานิลเจอรานิออล (geranylgeraniol) ตลอดจน สคัวลีน (squalene) และไฟโทอีน (phytoene) อย่างไรก็ตามการต่อกันของหน่วยไอโซพรีนแบบหาง-หางก็มีให้เห็นอยู่บ้าง ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากการจัดตัวใหม่ขณะเกิดปฏิกิริยาหรือการถูกเติมด้วยคาร์บอนของวิถีทางชิคีเมต แอซีเทต และการปิดวงหรืออื่นๆ สำหรับสารประกอบที่มาจากวิถีชีวสังเคราะห์อื่นแต่ก็มีหน่วยไอโซพรีนอยู่ด้วย ทั้งนี้เกิดจากปฏิกิริยาแอลคิลเลชันของหมู่ พรีนิล (prenyl) เช่น กับโปรตีนซีสเทอีน (cysteine) เป็นต้น เทอร์พีนอยด์มีประโยชน์ที่เห็นได้ชัดคือ หน่วยไอโซพรีนจะไปเพิ่มการละลายในไขมัน (lipophilicity) ของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ให้มากขึ้น (วิลาส พุ่มพิมล, 2556)



ภาพประกอบ 2.1 ตัวอย่างโครงสร้างสารกลุ่มเทอพีนอยด์ในแอปเปิ้ล (*Malus pumila*) : (1) ursolic acid, (2) uvaol , (3) 2 α-hydroxyursolic acid, (4) 3 β-trans-cinnamoyloxy-2α hydroxyurs-12-en-28-oic acid , (5) 3 β-trans-p-coumaroyloxy-2 α-hydroxyurs-12-en-28-oic acid
(ที่มา: Szakiel *et al*, 2012)

3. เปบติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

4. โปรโตอัลกาลอยด์ (Protoalkaloid) ช่วยควบคุมการก่อตัวของเกล็ดเลือดและละลายลิ่มเลือด ลดความดันโลหิต และลดความเสี่ยงในการอุดตันของเส้นเลือดไปเลี้ยงสมองและหัวใจ

5. กาโนเดอร์สเตอโรน (Ganodersterone) ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ธรรมชาติ ช่วยลดการอักเสบ

6. อะดีโนซิน (adenosine) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้าย DNA หรือ RNA ของเซลล์ร่างกาย สามารถเข้าไปในเซลล์ที่ผิดปกติของร่างกาย และช่วยควบคุมไม่ให้เกิดเนื้องอก อะดีโนซินเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์พลังงานของเซลล์ที่เรียกว่า ATP ประโยชน์ในการยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจ และความดันโลหิต คลายกล้ามเนื้อ แก้อาการปวดโดยเฉพาะอาการปวดไมเกรนที่มีสาเหตุจากอาการเครียด (Shimizu *et al*., 1985)

2.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial)

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์

2.3.1.1 *Staphylococcus* เชื้อสกุลนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม เรียงตัวเป็นกลุ่ม (Gram-positive cocci in cluster) คล้ายพวงองุ่น จัดอยู่ในวงศ์ *Staphylococcacae* ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ เชื้อในสกุลนี้มีมากกว่า 40 species ส่วนใหญ่เป็น facultative anaerobes เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตและสร้างสีที่หลากหลายตั้งแต่สีขาวถึงสีเหลืองเข้ม บางสายพันธุ์พบเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ผิวหนัง ทำให้เกิดโรคจากผิวหนังที่รุนแรงและติดเชื้อบาดแผลต่อทางเดินปัสสาวะ ติดเชื้อมีหนอง เกิดฝีตามบริเวณต่างๆ สำหรับเชื้อ *S. aureus* เป็นกลุ่ม coagulase-positive Staphylococci แยกได้จากคน และสัตว์ เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางแพทย์ โดยจะพบบริเวณผิวหนัง (skin flora) และในรูจมูก (nasal carrier) ร้อยละ 20-40 (Yang *et al*., 2017)

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) เป็นเชื้อ *S.aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาด้านจุลชีพหลายกลุ่ม (multiple drug resistant) เช่น ยาเพนิซิลลิน (penicillins) เตตราไซคลีน (tetracyclines) ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration ; MIC) ต่อยาเมทิซิลลิน (methicillin) มากกว่าหรือเท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือมีค่า MIC ต่อยาออกซาซิลลิน (oxacillin) มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อที่ไวต่อยา methicillin เรียก methicillin-sensitive *S. aureus* (MRSA) เชื้อ MRSA เป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อผู้ที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ เช่น แผลผ่าตัด แผลน้ำร้อนลวก ไฟไหม้ ผู้ที่มีการใส่สายสวนปัสสาวะ การใช้เครื่องช่วยหายใจ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์, 2556)

S. epidermidis เป็นเชื้อที่มีความสำคัญที่สุดในกลุ่ม coagulase negative *Staphylococcus* ซึ่งปกติถือว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นของคน แต่บางครั้งอาจก่อโรคได้ มากกว่าร้อยละ

90 ของโรคติดเชื้อจาก coagulase negative *Staphylococcus* มักจะเป็นเชื้อนี้ *S. epidermidis* จะมีโคโลนีเป็นสีขาว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 มิลลิเมตร บางครั้งอาจพบมีการสลายเม็ดเลือดแดง ถ้าเพาะเชื้อบน blood agar ทำให้เห็นเป็นบริเวณใสรอบโคโลนี สามารถเจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ไม่มีการสร้างสปอร์ สามารถพบทั่วไปตามธรรมชาติและที่สำคัญคือพบเป็นเชื้อประจำถิ่นดังนั้นจะพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปตามผิวหนัง ลำคอ รูหู รูจมูก เพราะฉะนั้นในการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยถ้ามีการเตรียมการไม่ดีจะมีการปนเปื้อนเชื้อนี้ได้ง่ายมาก ทำให้การอ่านผลผิดพลาด เพราะจะเกิดความสับสนว่าเชื้อมีการปนเปื้อนหรือเป็นเชื้อก่อโรคจริงๆ พบว่า *S. epidermidis* จัดเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการก่อโรคได้ต่ำมาก ดังนั้นในคนปกติจะไม่เกิดอาการของโรค ซึ่งเชื้อจะไม่มีการสร้าง alpha hemolysin เอนไซม์ coagulase หรือโปรตีนเอ ซึ่งเป็นปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. epidermidis* สามารถสร้าง hemolysin บางชนิด เช่น cytotoxin ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดไฟโบรบลาสต์ เอนไซม์บางชนิด เช่น hyaluronidase และlipase แต่มีพิษไม่รุนแรงและไม่ทุกสายพันธุ์ของ *S. epidermidis* ที่สามารถสร้างได้ (พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์และคณะ, 2538)

2.3.1.2 *Bacllilus* species

จัดเป็นกลุ่ม aerobe รูปร่างท่อน แกรมบวก มักพบต่อกันเป็นสายโซ่เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้ (spore-forming bacteria) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนมพาสเจอร์ไรส์ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่สลายซากพืชซากสัตว์ (saprophytic organism) ซึ่งพบมากในดิน น้ำ และอากาศ หรือบนผักผลไม้ เช่น *B. cereus* และ *B. subtilis* บางชนิดก่อโรคในแมลงโดย *B. anthracis* ยังเป็นสาเหตุของโรค anthrax นอกจากนี้ *B. cereus* ยังสามารถเจริญในอาหารและสร้าง enterotoxin หรือ emetic toxin ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ จุลินทรีย์เหล่านี้อาจก่อโรคในมนุษย์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทำให้เป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ เยื่อบุหัวใจอักเสบ การอักเสบในลูกตา (endophthalmitis) เยื่อบุตาอักเสบ (conjunctivitis) หรือโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบแบบ เฉียบพลัน (acute gastroenteritis) (Aouadhi *et al*., 2014)

B. cereus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนขนาดใหญ่ที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ติดสีแกรมบวก โดยเชื้อ *B. cereus* จะก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) พบว่ามีการระบาดเป็นครั้งคราว ทำให้เชื้อ *B. cereus* ที่มีการปนเปื้อนในอาหารสามารถสร้างสารพิษจำนวนมากได้ โดยจะก่อให้เกิดอาการ 2 แบบคือ แบบอาเจียน (emetic form) มีระยะฟักตัวสั้น 1-6 ชั่วโมงภายหลังการรับประทานอาหารนั้น โดยจะมีอาการอาเจียนหรืออุจจาระร่วง อีกแบบหนึ่งคือแบบอุจจาระร่วง (diarrheal form) มีระยะฟักตัวยาวนานกว่า ประมาณ 10-12 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้องอุจจาระร่วงเป็นน้ำ นอกจากนี้เชื้อ *B. cereus* ยังก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสได้ เช่น โรคโลหิต

เป็นพิษ โรคกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ การติดเชื้อบริเวณบาดแผล และโรคปอดบวม (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) นอกจากนี้เชื้อ *B. cereus* สามารถสร้างสารพิษ 2 ชนิด ได้แก่ อิมิทิกทอกซิน (emetictoxin) ทำให้เกิดอาการอาเจียน และเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ทำให้เกิดอุจจาระร่วง (Aouadhi *et al*., 2014)

2.3.1.3 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์เป็นรูปแท่ง ขนาด 1.1-1.5 × 2.0 - 6.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวอาจอยู่แบบเซลล์เดี่ยว หรืออยู่เป็นคู่ มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน สามารถสร้างแคปซูลและสารพิษ อาจเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาหรือไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือ ไร้ออกซิเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภัทรชัย กีรติสิน, 2549; โสภณ คงสำราญ, 2524; Holt *et al*., 1994) โคโลนีเรียบ ไม่มีสี เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2-3 มิลลิเมตร เชื้อเจริญในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากเฟอร์เมนต์แล็กโทส หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547)

E. coli เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ สามารถก่อโรคได้บ่อยกว่าแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เหมือนกัน ซึ่งส่วนใหญ่ก่อโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารได้ โดยโรคติดเชื้อ *E. coli* ที่สำคัญ ได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบการติดเชื้อในกระแสโลหิต และโรคติดเชื้ออื่นที่พบได้ เช่น การติดเชื้อของบาดแผล ซึ่งก่อโรคได้ทั้งในคนปกติและคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง จัดเป็นเชื้อก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบบ่อยที่สุด *E. coli* ที่เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรค แต่ในบางบุคคล อาจพบสายพันธุ์ก่อโรคปนอยู่ได้ การเกิดโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อในกระแสเลือดส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อประจำถิ่น เรียกการติดเชื้อแบบนี้ว่า endogenous infection พบบ่อยในผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในขณะที่การก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจและเยื่อหุ้มสมอง มักเกิดจากการได้รับเชื้อก่อโรคจากภายนอก การก่อโรคในแต่ละระบบอาจเกิดจาก *E. coli* ต่างสายพันธุ์ ที่มีกลไกการก่อโรคและสร้างปัจจัยก่อโรคที่แตกต่างกัน (Holt *et al*., 1994)

2.3.1.4 *Proteus* spp.

Proteus mirabillis เป็นส่วนหนึ่งของตระกูล Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบขนาดเล็กและ facultative anaerobe มีเอกลักษณ์เฉพาะด้วยความสามารถในการจับกลุ่มความสามารถในการหมักมอลโตสและหมักแลคโตส นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ พบรายงานว่าโรคนิ่วไตและการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งจำแนกได้เป็น 2 แบบ คือ การเกิดนิ่วแล้วส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะตามมา (stone with subsequent infections) และนิ่วที่เกิดจากการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (infection-induced stones) ซึ่งนิ่วชนิดหลังนี้มักมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอส เช่น *Proteus* spp. โดยการติดนี้ส่งผลให้เกิดนิ่วสตรูไวท์ (struvite) ที่มักพบองค์ประกอบทางเคมีในก้อนนิ่วเป็นแมกนีเซียม แอมโมเนียมฟอสเฟต โดยแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ยูรีเอสย่อย สลายยูเรียได้เป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นแอมโมเนียจะรวมตัวกับน้ำกลายเป็นแอมโมเนียมไอออน และไฮดรอกไซด์ไอออน ส่งผลให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดฟอสเฟตไอออนเพิ่มขึ้นเมื่อแอมโมเนียมไอออนและฟอสเฟตไอออนรวมตัวกับ แมกนีเซียมไอออนที่มีอยู่ในปัสสาวะส่งผลให้เกิดผลึกแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือสตรูไวท (Prywer & Torzewska, 2012)

2.3.1.5 *Pseudomonas*

Pseudomonas จัดอยู่ในวงศ์ Pseudomonadaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง กลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ แต่ใช้ไฮโดรเจนซัลไฟด์บางชนิดก่อโรค จำแนกเชื้อเป็น 6 กลุ่ม โดยอาศัยความเหมือนของลำดับเบส (DNA homology) ของยีน 16s rDNA ได้แก่ *P. aeruginosa* group, *P. stutzeri* group, *P. putida* group, *P. fluorescens* group, *P. chlororaphis* group, *P. syringae* group หรือจำแนกเชื้อเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการผลิตรงควัตถุเรืองแสง ได้แก่ กลุ่มที่สามารถละลายน้ำได้และเรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง (watersoluble, yellow-green fluorescent pigment) เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตขนาดความยาวคลื่น400 นาโนเมตร ได้แก่ *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* และกลุ่มที่ไม่สามารถผลิตรงควัตถุเรืองแสงชนิดไพโอเวอร์ดิน ได้แก่ *P. stutzeri*, *P. alcaligenes* และสปีชีส์อื่นๆ (Huang *et al*., 2017)

P. aeruginosa ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ที่เคลื่อนที่ได้ โดยใช้แฟลกเจลลาชนิดโมโนไทรคัส (monotrichous flagella) บางสายพันธุ์สร้างชั้นเมือกอยู่ภายนอกเซลล์มีลักษณะคล้ายแคปซูล เรียกว่า surface slime เชื้อสามารถมีชีวิตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารอาหารเพียงเล็กน้อย ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส จึงพบเชื้อได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติและในโรงพยาบาล เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป โคโลนีมีลักษณะหลากหลาย เช่น แบนราบ ขอบไม่เรียบ รูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน มักจะเป็นแผ่นเล็กน้อยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า-ฮีโมไลซีส (β-hemolysis) ลักษณะโคโลนีบน MacConkey agar ไม่มีสี (non-lactose fermenting colonies; NLF) มีกลิ่นเฉพาะตัวคือ หอมคล้ายองุ่น (grap-like หรือ corn-taco like odor) เชื้อสามารถสร้างรงควัตถุเรืองแสงชนิดไพโอเวอร์ดิน และชนิดไม่เรืองแสงได้หลายชนิด โดยเชื้อส่วนใหญ่จะสร้างรงควัตถุชนิดไพโอไซยานิน (pyocyanin) จึงมักจะพบลักษณะโคโลนีมีสีเขียวแกมน้ำเงิน เชื้อส่วนน้อยจะสร้างรงควัตถุไพโอรูบิน (pyorubin) หรือไพโอเมลานิน (pyomelanin) ทำให้โคโลนีมีสีแดงหรือสีน้ำตาล-ดำ ตามลำดับ บางครั้งพบลักษณะเยิ้มเป็นมูก (mucoid type) ไม่มีสี ลักษณะโคโลนีบน blood ager และ triple sugar iron agar (TSI) เป็นมันวาวสีเทาดำสะท้อนแสงคล้ายโลหะ (metallic sheen) เชื้อนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในเวลา 18-24 ชั่วโมง ยกเว้นสายพันธุ์ที่เป็นมูกเยิ้มอาจใช้เวลาถึง 48 ชั่วโมง เป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญในที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล เป็นสาเหตุการติดเชื้อในเยื่อหุ้มสมอง ทำให้สมองอักเสบในผู้ใหญ่ (ABM) ติดเชื้อในโรงพยาบาลที่พบได้บ่อย เช่น การติดเชื้อบริเวณบาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก การติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด ปอดบวม (hospital acquired pneumonia) การติดเชื้อในกระแสโลหิต การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะที่มีการใส่สายสวน การติดเชื้อบริเวณแผลกดทับ (bedsore) ส่วนโรคที่พบบ่อยในคนปกติทั่วไปคือหูชั้นนอกอักเสบ (otitis externa) ซึ่งมักจะพบในคนที่ชอบว่ายน้ำ เรียกว่า swimmer's ear กระจกตาอักเสบในผู้ที่ใส่คอนแทคเลนส์ และการมีผื่นบริเวณผิวหนังในผู้ใช้ที่อ่างอาบน้ำ (Jacuzzi syndrome) และการติดเชื้อที่ฐานเล็บ (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556; (Huang *et al*., 2017)

2.3.1.6 *Salmonella* spp.

Salmonella เป็นส่วนหนึ่งของตระกูล Enterobacteriaceae ก่อให้เกิดโรคในคน และสัตว์ได้ เช่น *Salmonella thyph*imurium ก่อโรคเฉพาะในคนเท่านั้น โรคทางเดินอาหารเฉียบพลัน การติดเชื้อในกระแสโลหิต เป็นแบคทีเรียสกุลใหญ่ สามารถจำแนกเชื้อโดยการใช้คุณสมบัติแอนติเจนและแบคเทอริโอฟาจได้กว่า 1900 ชนิด *Salmonella* ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ บางชนิดมีแคปซูล บางชนิดอยู่ได้นานในอาหารแห้ง เช่น ในนมผง มะพร้าวแห้ง สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่ว

โลก ก่อให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด นก สัตว์เลื้อยคลาน และปนเปื้อนออกมากับอุจจาระ อีกทั้งยังอาจพบในดิน น้ำ อาหารสัตว์เนื้อสด (Quinn *et al*., 2002)

2.3.1.7 ยีสต์ก่อโรคสกุล Candida

เชื้อในสกุล Candida จัดเป็น Yeast-like fungi คือ ตัวเชื้อเป็นยีสต์เซลล์ มีรูปกลมหรือรี สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (Budding) ได้เป็น blastoconidia และพบสร้างได้ทั้ง true hyphae และ pseudohyphae เชื้อ candida มีหลาย species ที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบบ่อยๆ คือ *Candida albicans* (ประมาณร้อยละ 90 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ เชื้อ *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C.parapsilosis*, *C. krusei* และ *C. guilliermondii* เป็นต้น พบเชื้อก่อโรคได้ทั่วไปในธรรมชาติในน้ำ อาหาร ดินและในร่างกายของคน เช่น ที่ผิวหนังในช่องปาก ทางเดินอาหาร ช่องคลอด โดยพบเชื้อได้เป็น normal flora ของคนปกติ การเกิดโรคนอกจากเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของตัวเชื้อเองแล้ว ยังเกี่ยวกับสภาวะร่างกายของผู้ป่วยด้วย ผู้ที่เสี่ยงต่อการติดโรคคือ ผู้ที่มีความต้านทานของร่างกายต่ำ ได้แก่ผู้ป่วย โรคมะเร็ง เบาหวาน โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในกระแสเลือดในโรงพยาบาลและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหมู่ผู้ป่วยที่ป่วยหนักและผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดทางช่องท้องผู้ป่วยที่รับยาปฏิชีวนะนานๆ สารเตียรอยด์ (steroid) ยาคุมกำเนิดและนอกจากนี้ยังพบบ่อยในเด็กคนชรา หญิงมีครรภ์ คนอ้วน และในผู้ป่วยหลังการผ่าตัด เป็นต้น โรค candidosis เป็นได้รับร่างกายทุกระบบ การติดเชื้อมักเป็นแบบ endogenous infection แต่บางครั้งอาจพบ exogenous infection ได้บ้าง (Pongrácz *et al*., 2015)

2.3.2 สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent)

สารต้านจุลชีพ หรือสารต้านจุลินทรีย์ เป็นสารที่เติมลงไปเพื่อป้องกันหรือชะลอการเสื่อมเสียยับยั้งการเจริญทั้งภายในและภายนอก จะเลือกทำลายเฉพาะเชื้อก่อโรคโดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ในร่างกายของคน (selective toxicity) อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็น รา ยีสต์ ไวรัส หรือแบคทีเรีย ดังนั้นคุณสมบัติของสารต้านจุลชีพนั้นต้องเป็นสารที่ให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีภายใต้สภาวะการทำงานอย่างเพียงพอ มีความคงตัว ไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่เติมลงไป ควรจะละลายได้ในน้ำหล่อเลี้ยงอวัยวะภายในร่างกายเพื่อที่จะเข้าถึงตำแหน่งที่มีเชื้อได้มีความเสถียรทั้งในกระแสโลหิต น้ำหล่อเลี้ยงอวัยวะภายในร่างกายและเนื้อเยื่อ และไม่ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการแพ้ ดังนั้น

จึงจำเป็นต้องค้นหาสารเพื่อที่จะพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเดิม

2.3.2.1 แหล่งกำเนิดของสารต้านจุลชีพ (source of antimicrobial agent)

1) จากธรรมชาติ (natural source) ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งเรียกสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ในธรรมชาตินี้ว่า ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ได้แก่ ยาเพนิซิลลิน (penicillin) ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium notatum*, เซฟาโลสปอรินส์ (cephaloporins) ผลิตจากเชื้อรา *Cephalosporium* species, คานาไมซิน (kanamycin) ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces kanamyceticus* , อีริโทรไมซิน (erythromycin) ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces erythreus*, เตตราไซคลีน (tetracycline) ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces aureofaciens* และยาคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces vanezuelae*

2) จากการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) เรียกว่า สารต้านจุลชีพชนิดเคมีสังเคราะห์ ได้แก่ ซัลฟาไดอะซิน (sulfadiazine) และกรดนาลิดิซิก (nalidixic acid) (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 2556)

จากศึกษาฤทธิ์สารต้านสารจุลชีพในเห็ด *Phellinus* และตัวอย่างเห็ด *Ganoderma* เนื่องจากเห็ด *Phellinus* และตัวอย่างเห็ด *Ganoderma* ได้ถูกนำมาใช้รักษาโรคแบบมีประสิทธิภาพ รวมทั้งปรับปรุงการไหลเวียนของเลือด รวมทั้งการกำจัดของเสียและสารพิษ (detoxication), ปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotection), โรคภูมิแพ้, โรคมะเร็ง, โรคท้องร่วง และโรคเบาหวาน โดยทั่วไป *Phellinus* จะถูกใช้รักษาผู้ที่ติดเชื้อและสามารถสกัดสารได้จากตัวทำละลายต่างๆ โดยอธิบายจากฤทธิ์ต้านจุลชีพ เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Candida* species, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* species, *Enterococcus* species, *Escherichia coli* และ *Acinetobacter* โดยวิธี broth tube dilution, disc diffusion และทดสอบกับ antibiotic คือ erythromycin และ ampicillin พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Ganoderma* สามารถต่อต้านเชื้อที่ทดสอบได้ดีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *Acinetobactor* และพบสารสกัดจากเห็ด *Phellinus* สามารถต่อต้าน *Acinetobactor* เมื่อใช้ acetone เป็น solvent ให้ค่า polarity และผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 5.1 และ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นอีกได้แก่ sesquiterpens และ triterpens นอกจากนี้พบว่าสารสกัดมีความเสถียรในสภาพที่เป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4-11 ซึ่งสามารถพัฒนานำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะในช่องปากที่มีศักยภาพอีกด้วย (Sonawane *et al*., 2014)

2.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

งานวิจัยนั้นจำเป็นต้องมีการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) เช่น การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์ต่อผลของอาหารเลี้ยงเซลล์ (medium/serum batch testing) หรือการทดลองผลของ growth factor ต่างๆ ที่มีต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตนั้นเป็นขั้นตอนเบื้องต้นในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในขบวนการพัฒนาขบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้ศึกษาผลการตอบสนองของเซลล์ที่มีสารทดสอบต่างๆ ซึ่งประเมินผลการทดสอบความเป็นพิษนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการศึกษาที่แตกต่างกันไปเช่น การทดสอบประสิทธิภาพทางยาหรือเครื่องสำอาง โดยตรวจสอบถึงความปลอดภัยและไม่เป็นพิษก่อนนำมาใช้ในคน ในทางตรงกันข้ามการคัดเลือกยาหรือสารสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งในกรณีนี้จำเป็นต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์มะเร็ง เป็นต้น ในอีกด้านหนึ่งการนำเซลล์มาใช้ในงานวิจัยเหล่านี้เป็นการช่วยลดการใช้สัตว์ทดลองลงด้วย การศึกษาความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตนั้นมีความซับซ้อนสูง ซึ่งระดับความเป็นพิษนั้นอาจมีผลในระดับเซลล์ เช่น ผลจากยาต้านมะเร็ง หรือกระทบทางด้านชีวภาพของระบบ เช่น ความเป็นพิษในสมอง หรือการอักเสบต่างๆ เป็นต้น ในการประเมินความเป็นพิษในสัตว์นั้นทำได้ยาก ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการใช้เซลล์เพื่อประเมินความเป็นพิษเบื้องต้น คำจำกัดความของความเป็นพิษในเซลล์นั้นอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบการประเมินผลเช่น การทำให้เซลล์ตายหรือเปลี่ยนคุณสมบัติของเซลล์ เช่นการหยุดการเจริญเติบโต (cytostasis) หรือ การหยุด differentiation ของเซลล์ (พร้อมสิน มาศรีนวน, 2558)

2.4.1 ตัวแปรที่สำคัญในการทดสอบการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์และความเป็นพิษนั้น เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ และมี reproducibility ที่ดีมีปัจจัยหลายประการที่ควรคำนึงถึง เช่น

2.4.1.1 คุณลักษณะของเซลล์ ได้แก่ ช่วงอายุเจริญเติบโต (growth state) kinetic และความแข็งแรงของเซลล์ โดยการทดสอบสารต่อเซลล์ที่ช่วงอายุแตกต่างกันอาจให้ผลที่แตกต่างกัน เช่น ทดสอบในเซลล์ที่เข้าสู่ช่วง stationary phase ซึ่งเป็นช่วงเซลล์ที่มีอัตราการเจริญเติบโต (growth fraction) ต่ำ และสัณฐานวิทยาของเซลล์ (morphology) ที่อาจเปลี่ยนแปลงไป อาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากการทดสอบในเซลล์ช่วงอื่น โดยทั่วไปแล้วจะทำการทดสอบเซลล์ที่อายุอยู่ในช่วง log phase และเก็บตัวอย่างเซลล์ในช่วงปลายของ log phase ซึ่งให้ผลที่สูงและมี reproducibility ที่ดี ดังนั้นในการออกแบบการทดลองจึงควรคำนึงถึงช่วงเวลาในการทดสอบรวมถึงคุณสมบัติของเซลล์ที่จะใช้ในการทดสอบด้วย

2.4.1.2 ฤทธิ์ของสารที่ใช้ในการทดสอบ ตัวอย่างเช่น สารบางชนิดทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว (cytostatic) แต่ไม่ทำให้เซลล์ตาย ซึ่งผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตภายหลังได้รับสารทดสอบอาจพบว่าขนาดของโคโลนีที่สร้างขึ้นมีขนาดเล็ก แต่จำนวนโคโลนีที่สร้างขึ้นไม่ลดลง

2.4.1.3 ระยะเวลาในการทดสอบ (duration of the exposure) ระยะเวลาที่ใช้ขึ้นกับฤทธิ์ของสารที่ต้องการศึกษา โดยการออกฤทธิ์อาจเป็นนาทีหรือหลายชั่วโมง

2.4.1.4 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ (concentration) ความเข้มข้นควรอยู่ในช่วงที่กว้างพอในการให้ข้อมูลถึงจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิต

2.4.1.5 อาหารเลี้ยงเซลล์และซีรั่มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (medium/serum) ในบางกรณีซีรั่มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอาจรบกวนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ทำให้การวิเคราะห์ผลอาจคลาดเคลื่อนไป

2.4.2 วิธีประเมินการตอบสนองต่อสารทดสอบ

วิธีการวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตหรือการวัดความเป็นพิษทำได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ใช้ในการศึกษา สภาวะของเซลล์ในการตอบสนองต่อสารที่ใช้รวมทั้งเซลล์เป้าหมาย ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลักๆ ดังนี้

2.4.2.1 การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viability) เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ตัวอย่างเช่น ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง หรือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยดูการตอบสนองต่อสารทดสอบในทันทีหรือในระยะสั้น อย่างไรก็ตามการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่างเซลล์ที่กำลังเพิ่มจำนวน (active dividing) หรือเซลล์ที่ในสภาพอยู่เฉยไม่แบ่งตัวได้ (quiescent) วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติการสูญเสียสภาพของเซลล์เมมเบรน (loss of membrane integrity) ในเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่เกิดเสียหาย (damage cell) หรืออาศัยคุณสมบัติของเซลล์ในการนำสารเข้าภายในเซลล์ การวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีนี้ทำได้หลายวิธีด้วยกัน ยกตัวอย่างวิธีที่นิยมใช้กัน เช่น Trypan blue exclusion dyes, Fluorescent based live/dead staining, LDH leakage และ Neutral red assay

2.4.2.2 การวัดการรอดชีวิต (Survival) หรือเรียก Colony formation assay แม้ว่าการทดสอบ short-term test จะทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่ผลที่ได้จากการทดสอบเป็นการวัดจำนวนเซลล์ขณะที่ทำการทดลองนั้น ซึ่งสารต่างๆ เช่น รังสี หรือ ยาบางชนิด ออกฤทธิ์ในระยะยาว ดังนั้นการทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์ภายหลังจากได้รับสารทดสอบแสดงให้เห็นถึงความสามารถของเซลล์ในการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (reproductive ability) จนได้กลุ่ม colony หรือ clone ขนาดใหญ่ ซึ่งการสร้าง clone นี้เรียกว่า clonogenic คุณลักษณะของ clone ที่ปรากฏสามารถบอกความแตกต่างทั้งในด้านอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยดูจากของขนาดของ colony ที่สร้างขึ้น

และการรอดชีวิตของเซลล์จากจำนวนของ colony ผลที่ได้แสดงในลักษณะ cell survival curve ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ของปริมาณสารทดสอบกับสัดส่วนในการรอดชีวิตของเซลล์

2.4.2.3 การวัดจำนวนเซลล์จากปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมที่เกิดในเซลล์ (metabolic) ในการวัดการเจริญเติบโตและความเป็นพิษของเซลล์ สามารถวิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเมทาบอลิซึมที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็น maker ที่แสดงถึงการมีชีวิตของเซลล์ เช่น dehydrogenase activity, การสังเคราะห์ DNA, RNA, โปรตีน หรือการสร้าง ATP โดยต่อไปนี้จะกล่าวถึง Tetrazolium reduction assays ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยใช้สารประกอบ Tetrazolium หลายชนิดถูกใช้ในการทดสอบเซลล์ที่มีชีวิต ที่นิยมใช้ได้แก่ MTT, XTT, WST-1 ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

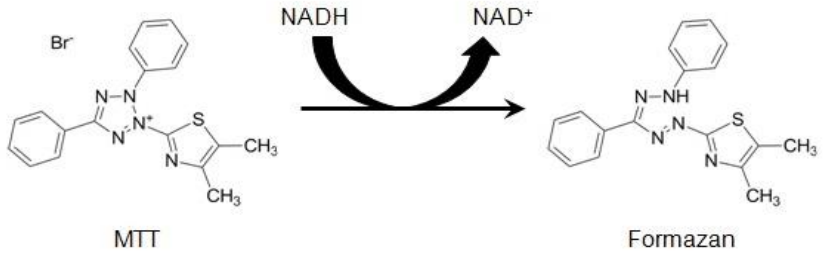
1) MTT มีคุณสมบัติผ่านเข้าเซลล์ได้

2) XTT, WST-1, CCK-8 ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยต้องอาศัย intermediate electron acceptor ในการส่ง electron จากภายในเซลล์ ซึ่งเกิดปฏิกิริยา reduction ให้ formazan product ที่มีสี (พร้อมสิน มาศรีนวน, 2558)

การวิเคราะห์วิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MTT เป็นวิธีการทดสอบที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยทำการทดลองบน 96-well microplate ซึ่งเหมาะสมในการวิจัยที่ต้องการตรวจคัดกรองที่รวดเร็ว (high-throughput screening) หลักการทำงานของ MTT คือ เซลล์ที่มีชีวิตมีคุณสมบัติ metabolically active ซึ่งมี dehydrogenase enzyme สามารถเปลี่ยน MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (ดังภาพประกอบ 2.2) โดยเมื่อทำการละลายผลึกด้วยตัวทำละลายแล้วจะให้สารสีน้ำเงินม่วงและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 550-600 nm ค่าความเข้มข้นของสีน้ำเงินม่วงจากผลึก formazan นั้นจะแปรผันตรงกับปริมาณ dehydrogenase enzyme ในเซลล์ที่มีชีวิต

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 2.2 แสดงปฏิกิริยา reduction ของ MTT ให้ formazan product
(ที่มา: Riss *et al*., 2013)

ข้อดีคือ ราคาไม่แพงและในการทดลองไม่จำเป็นต้องย้ายเซลล์ ขั้นตอนทุกอย่างทำอยู่บน microplate เดียว ส่วนข้อจำกัดคือ Forman ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยามีสมบัติไม่ละลายน้ำ จำเป็นต้องทำละลายผลึก formazan ด้วยตัวทำละลายก่อนซึ่งขั้นตอนนี้อาจทำให้ค่าปฏิกิริยาที่ได้ในแต่ละหลุมมีความคลาดเคลื่อนได้ การทดลองสามารถวัดได้เพียงช่วงเวลาเดียวไม่สามารถวัดได้หลายช่วงเวลาที่ทดสอบ และเซลล์ที่มีเมทาบอลิซึมต่ำ เช่น lymphocyte ต้องใช้จำนวนเซลล์ในการทดสอบสูง (Riss *et al*., 2013)

จากการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านเนื้องอกของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* โดยสกัด intracellular polysaccharide (IPS) ที่ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ด *P. igniarius* นำมาตกตะกอนเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์ด้วย ion-exchange และ size exclusion chromatography สามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ได้แก่ IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 และ IPSW-4 นำไปวิเคราะห์ IR และ UV พบว่าสารเป็นประเภทของกลุ่ม pyran และไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเนื้องอกของพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์โดยวิธี MTT สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 และ HepG2 ได้ในระดับหนึ่งซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ดังนั้นอาจนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งต่อไปได้ (Li *et al*., 2015)

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared Spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกถึงปริมาณองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด เทคนิคนี้มีความไว ใช้ระยะเวลาตรวจสอบน้อยกว่าเทคนิคอื่นๆ สำหรับ Infrared (IR) Spectroscopy นั้นเป็นเทคนิค Spectroscopic ทั่วๆ ไปที่ใช้ในทางเคมีอินทรีย์และเคมีอนินทรีย์

โดยการทำการตรวจวัดการดูกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ตรวจสอบ โครงสารของสาร โดยการวัดการดูกลืนรังสีอยู่ในช่วงอินฟราเรดเลขคลื่น (wave number) ประมาณ 12,800 – 10 cm^{-1} ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ องค์ประกอบของเครื่อง FT-IR แหล่งกำเนิด Laser เพื่อใช้แสง Laser ในการปรับระยะของ มี Mobile Mirror เป็นกระจกเงาที่สามารถสะท้อน รังสีอินฟาเรดและสามารถที่จะเคลื่อนที่ได้ มี Fixed Mirror เป็นกระจกเงาที่สามารถสะท้อนรังสีอินฟาเรดเช่นเดียวกับ Mobile Mirror แต่ไม่สามารถที่จะเคลื่อนที่ได้ มี Beam Splitter เป็นส่วนที่จะทำการแยกอินฟาเรดที่ผ่านเข้ามาให้เป็นสองส่วนคือ สามารถให้แสงทะลุผ่านได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะสะท้อนกลับ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นกระจกเงาที่สามารถสะท้อนรังสีอินฟาเรดใช้ในการการบังคับทิศทางการเดินของรังสีอินฟาเรดให้ไปตามทิศทางที่ต้องการ ส่วน Sample Compartment เป็นส่วนที่จะใช้ในการบรรจุตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์ และ Detector ใช้วัดความเข้มแสงที่เหลือจากการดูดกลืนของตัวอย่าง (แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ, 2539)

หลักการทำงานของเครื่อง FT-IR มีดังนี้ (John Wiley & Sons, 2000)

1. แหล่งกำเนิดรังสีอินฟราเรดจะทำการผลิตรังสีอินฟราเรดในช่วงความยาวคลื่นหรือเลขคลื่นที่จะใช้ในการวิเคราะห์

2. Beam Splitter จะปล่อยให้ทะลุผ่านไปที่ Fixed Mirror 50 เปอร์เซ็นต์ และสะท้อนกลับมาที่ Mobile Mirror 50 เปอร์เซ็นต์

3. จากนั้น Fixed Mirror จะสะท้อนกลับมาที่ Beam Splitter

4. Mobile Mirror จะสะท้อนกลับมาที่ Beam Splitter

5. อินฟราเรดที่สะท้อนมาจากทั้ง Mobile Mirror และ Fixed Mirror จะมารวมกันและเกิดการแทรกสอดกันขึ้น แต่จากการที่ Mobile Mirror สามารถเคลื่อนที่ได้โดยการควบคุมระยะการเคลื่อนที่โดย laser เมื่อ Mobile Mirror เคลื่อนที่ก็จะทำให้ระยะการสะท้อนกลับของรังสีอินฟราเรดของ ทั้ง Mobile Mirror และ Fixed Mirror ไม่เท่ากันซึ่งจะส่งผลให้รังสีอินฟราเรดที่ได้มีความยาวคลื่นเปลี่ยนไปเนื่องจากการแทรกสอด แบบเสริมกันหรือหักล้างกัน เรียกว่า Interferogram

6. อินฟราเรดที่ความยามคลื่นต่างๆ จะสะท้อนไปที่ Sample Compartment ผ่าน sample ซึ่งมีการดูดกลืนอินฟราเรดเอาไว้บางส่วนในความยาวคลื่น ส่วนอินฟราเรดที่ไม่ถูกดูดกลืนก็จะผ่านเข้าสู่ Detector สัญญาณที่ได้คอมพิวเตอร์จะทำการแปลงสัญญาณ Interferogram ด้วยสมการ Fourier Transform ผลที่ได้จะเป็นสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ

จากการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *Phellinus linteus* ที่เพาะเลี้ยงและแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยสกัดสารด้วยน้ำร้อนและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเซลลูโลส DEAE-52 และคอลัมน์

โครมาโตกราฟี Sephadex G-100 ได้พอลิแซ็กคาไรด์ PLPS-1 และ PLPS-2 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR พบค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ function มีความคล้ายคลึงกัน โดยแสดง หมู่ O-H พีคประมาณ 3434–3444 cm^{-1}, C=O ช่วงพีคระหว่าง 1633–1635 cm^{-1}, C-H มีช่วงพีคระหว่าง 1383–1384 cm^{-1} และ C-O-C พีคประมาณ 1028–1093 cm^{-1} และมีอยู่ของวงแหวน pyranose ในพอลิแซ็กคาไรด์ (Mei *et al.*, 2016)

จากการศึกษาการเปรียบเทียบลักษณะสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา ได้แก่ *Antrodia cinnamomea* (AC-P), *Coriolus versicolor* (CV-P), *Grifola frondosa* (GF-P), *Ganoderma lucidum* (GL-P) และ *Phellinus linteus* (PL-P), พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เห็ดทั้ง 5 ชนิดนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR พบค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ function ที่ตำแหน่งไม่แตกต่างกัน มีความคล้ายคลึงกัน โดยแสดง O-H พีคประมาณ 2930 cm^{-1}, C-H มีช่วงพีคระหว่าง 1175 - 1,000 cm^{-1} และ C-O-C , C-O-H มีพีคประมาณ 1,050 cm^{-1} และมีอยู่ของวงแหวน pyranose ในพอลิแซ็กคาไรด์ (Su *et al*, 2016)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิภาพร อามัสสาและนิวัฒ เสนาะเมือง (2550) ศึกษาเห็ดหิ้งจำนวน 21 ชนิด และเห็ดที่เพาะเลี้ยงในเชิงการจำนวน 2 ชนิด มาศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การเจริญของเส้นใยบนอาหารแข็ง 5 ชนิดที่ใช้คือ รำข้าว (rice brand dextrose malt peptone agar-RbDMPA), มันสำปะหลัง (cassava dextrose malt pep), มันฝรั่ง (potato dextrose malt peptone agar-PMPA) และ PDA (potato dextrose agar) หลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.001$) โดยภาพรวมเห็ดหิ้งเจริญบน RbDMPA, CDMPA, SpDMPA, PMPA และ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 47.5$\pm$18.1, 47.0$\pm$16.3, 46.1$\pm$18.2, 44.6$\pm$19.0 และ 44.8$\pm$19.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเส้นใยของเห็ดที่เจริญบนอาหาร RbDMPA และ PMPA มีลักษณะหนากว่าเส้นใยบนอาหารชนิดอื่น

อนัญพร พรหมเมตตา (2554) ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของเห็ด *Phellinus linteus* และ *P. igniarius* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหิ้งชนิดอื่น ผลการศึกษาพบว่าลักษณะเส้นใยของ *P. linteus* และ *P. igniarius* มีสีขาว พบผนังกั้นภายในเส้นใย เบสิดิโอสปอร์ของ *P. linteus* มีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเฉลี่ย 2.6-3.1 x 3.1-4.5 ไมโครเมตร เบสิดิโอสปอร์ของ *P. igniarius* มีลักษณะกลมรี ขนาดเฉลี่ย 2.8-3.2 x 3.5-4.0 ไมโครเมตร เห็ดทั้งสอง

ชนิดจะสร้างแคลมป์เซลล์ (camp cell) และเพกเซลล์ (peck cell) บนเส้นใยไดคาริออน (dykaryon) เส้นใย *P. linteus* และ *P. igniarius* สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร malt extract agar การทดลองเลี้ยงอาหารในอาหารธรรมชาติพบว่าเห็ดทั้ง 2 ชนิด สามารถเจริญได้ดี *P. linteus* สามารถเจริญพัฒนาเป็นดอกเห็ดบนถุงเพาะได้ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ยีน nuclear large subunit rDNA พบว่า *P. linteus* และ *P. igniarius* จากประเทศไทยมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการกับเห็ดหิ้งจากภูมิภาคอื่นของโลก

Kim *et al*. (2002) ศึกษาการผลิต exo-biopolymer (EBP) จากเส้นใยของเห็ดกินได้ 19 ชนิดโดยผลิตในอาหารเหลว ใช้สูตรอาหารเหลว 3 สูตร ได้แก่ potato malt peptone (PMP), mushroom complete medium (MCM) และ yeast malt extract (YM) ลงในถังหมักปริมาตร 3 ลิตร สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเติมอากาศ อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 เก็บผลในวันที่ 5, 10 และ 15 พบว่าเห็ด 19 ชนิด จะมีค่าน้ำหนักเส้นใยแห้งสูงและ EBP ผลิตได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PMP นาน 15 วัน โดยเฉพาะเห็ด *Ganoderma lucidum* No.1 และเห็ด *P. linteus* KCTC 6190 มีค่าน้ำหนักแห้งของ EBP เท่ากับ 1168 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1520 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำ *G. lucidum* No.1 และเห็ด *P. linteus* KCTC 6190 มาเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PMP ที่สภาวะเดิม พบว่าผลิต EBP ได้เท่ากับ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2410 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงระยะเวลาน้อยกว่า 15 วันจะมีการผลิตเส้นใยและ EBP ในปริมาณน้อย

Meng *et al*. (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต Exopolysaccharides (EPS) ของเห็ด *Morchella esculenta* SO-02 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองพบว่าสูตรของอาหารจะมีส่วนประกอบของรำ 200 กรัม, glucose 30 กรัม, yeast extract 1 กรัม, KH_2PO_4 และ $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 1.5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปริมาตรอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight, DCW) และ EPS เท่ากับ 9.2 และ 2.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ EPS ด้วยวิธี superoxide anion radical scavenging, reducing power และ hydroxyl radical scavenging พบว่า EPS จากเห็ด *Morchella esculenta* SO-02 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

Ren *et al*. (2014) ศึกษาฤทธิ์สารต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดของเห็ดกินได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Auricularia cornea*, *Calvatia gigantean*, *Hericium coralloides*, *Pleurotus australis*, *Ileodictyon cibarium*, *Hericium erinaceum*, *Lentinula edodes* และ *Cordyceps sinensis* โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี disc diffusion และ

microdilution (MIC) พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Cordyceps sinensis* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtillis* และ *Streptococcus epidermis* ผลค่า MIC เท่ากับ 938 และ 469 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *P. australis* ยับยั้ง *S. epidermis* มีค่า MIC 469 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบโดยวิธี DPPH ได้สูงที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 4.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและจากการวิเคราะห์ด้วย FT-IR พบว่าโครงสร้างเป็น α หรือ β-conformation ประกอบด้วย OH และ CH group

Sonawane *et al.* (2014) ศึกษาฤทธิ์สารต้านสารจุลชีพของสารสกัดเห็ด *Phellinus* และ Ganoderma ต่อเชื้อ *Candida species*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* species, *Enterococcus* species, *Escherichia coli* และ *Acinetobacter* โดยวิธี broth tube dilution, disc diffusion และทดสอบกับ antibiotic คือerythromycin และ ampicillin พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Ganoderma* สามารถต่อต้านเชื้อที่ทดสอบได้ดีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *Acinetobactor* และพบสารสกัดจากเห็ด *Phellinus* สามารถต่อต้าน *Acinetobactor* เมื่อใช้ acetone เป็น solvent จะให้ค่า polarity และ yield สูงสุดเท่ากับ 5.1 เปอร์เซ็นต์ และ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นอีกได้แก่ sesquiterpens และ triterpens นอกจากนี้ยังว่าสารสกัดจะมีความเสถียรในสภาพที่เป็นกรดด่าง (pH 4-11) สามารถพัฒนานำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะในช่องปากที่มีศักยภาพอีกด้วย

Wang *et al*. (2014) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยาของพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *Phellinus nigricans* ทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) และวิเคราะห์มอนอแซ็กคาไรด์ (momosaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบพอลิแซกคาไรด์และศึกษาโครงสร้างโดยใช้ GC และ FT-IR โดยสามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 3 ชนิด คือ PNMP 1, PNMP 2 และ PMNP 3 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 28.4, 31.5 และ 26.1 kDa ตามลำดับ สำหรับ PNMP 1, PNMP 2 ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ 6 ชนิด ได้แก่ arabinose, fructose, glucose, galactose, mannose และ xylose ส่วน PMNP 3 ประกอบด้วยมอนอแซ็กคาไรด์ 4 ชนิด ได้แก่ glucose, galactose, mannose และ xylose ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า ชนิด PNMP 1, PNMP 2 มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ส่วน PNMP 2 และ PMNP 3 จะพบสารพวก mitogen เช่น concanavalin a หรือ lipopolysaccharide กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีการแบ่งตัวและพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสามชนิดมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย

Jiang *et al*. (2015) ศึกษาลักษณะและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ด *Phellinus pini* ในอาหารเหลวที่เหมาะสม สามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ได้สองชนิด ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธ์

(polysaccharide from mycelium , PPM) และพอลิแซ็กคาไรด์แยกจากน้ำเลี้ยงเห็ด (polysaccharide from culture medium, PPE) ทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้วิธี gel filtration พบว่า PPM และ PPE มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22.0 และ 38.0 kDa ตามลำดับ จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ heteropolysaccharides โดยวิธี GC และ FT-IR พบ mannose, galactose และ glucose ที่มีอัตราส่วนเท่ากับ 2.99 : 1.00 : 0.34 และ 38.40 : 1.00 : 1.76 ตามลำดับ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, chelate ferrous ion และ reduce ferric ion พบว่าการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของ PPM ดีกว่า PPE ดังนั้น PPM อาจจะสามารถนำมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติอีกด้วย

Pei *et al.* (2015) ศึกษาลักษณะโครงสร้างและฤทธิ์ต้านเนื้องอกของพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. linteus* โดยใช้ alkaline เป็นสารสกัด ซึ่งได้พอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลสูงชนิดใหม่ (a novel high molecular weight polysaccharide, PL-N1) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี DEAE-Sephadex A-25 และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี High-pressure gel permeation chromatography (HPGPC) ประมาณ 343,000 kDa วิเคราะห์หาองค์ประกอบมอนอแซ็กคาไรด์ของ PL-N1 โดยวิธี GC ได้แก่ อะราบิโนส, ไซโลส, กลูโคส และกาแลกโตสในอัตราส่วน 4.0 : 6.7 : 1.3 : 1.0 M วิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธี FTIR และ NMR spectroscopies และ methylation assay และทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านเนื้องอกโดยวิธี MTT แสดงค่า PL-N1 ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ได้ระดับหนึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณด้วย ดังนั้น PL-N1 อาจได้รับการพัฒนาเป็นสารจากธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านทานเนื้องอกต่อไปได้

Zhang *et al*. (2015) ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติ ลักษณะ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากดอกเห็ด *P. baumii* ที่เจริญในอาหารต่างชนิดกัน 3 ชนิด ได้แก่ mulberry branches, mixed wood sawdust และอาหารผสม mulberry branches และ mixed wood sawdust วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย gel permeation chromatography สามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 3 ชนิด ได้แก่ PPB-MB, PPB-MW และ PPB-MM พบองค์ประกอบแตกต่างกันดังนี้ PPB-MM ประกอบด้วยน้ำตาลสูงสุด 66.59% และ uronic acid 23.38% และ พบ PPB-MW มีส่วนประกอบโปรตีนมากสุด นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ชนิดยังพบมอนอแซ็กคาไรด์อีก 6 ชนิดได้แก่ fucose, mannose, galactose, xylose, arabinose และ glucose การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Lipid peroxidation inhibition, ATBS radical scavenging และ Fe^{2+} chelating assay พบว่า PPB-MM มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดและอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ mixed wood sawdust และ อาหารผสม mulberry branches และ mixed wood sawdust

Jin *et al*. (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการป้องกันการแตกหักของดีเอ็นเอ DNA damage protection ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากเห็ด *P. baumii* และทำให้สารสกัดบริสุทธ์ด้วย chromatography ใช้ DEAE-52 และ anion-exchage โครมาโตกราฟีและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, hydroxyl radicals, superoxide radicals และ DNA damage protection ใช้วิธี DNA nicking พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ PPB-2 ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส อะราบิโนส กาแลกโตส กลูโคส ไซโรส และแมนโนส ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการแตกหักของดีเอ็นเอได้ดี

Yan *et al*. (2016) ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากเส้นใยเห็ด *P. lintues* โดยทำการสกัดด้วย petroleum ether และน้ำร้อน ทำให้สารสกัดบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟี ใช้ DEAE Sepharose Flast-Flow column และ Sephacryl S-400 HR column โครมาโตกราฟี ผลการวิเคราะห์พบพอลิแซ็กคาไรด์ PLP1-I ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลกโตสมี Molecular weight (M_w) ประมาณ 290,000 kDa ลักษณะโครงสร้างประกอบด้วยพันธะหลัก (1,4)-α-D-glucopyranose และ (1,3)-α-D-galactopyranosyl และพบว่า PLP1-I มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านอนุมูลอิสระนำไปใช้ในอาหารและยาได้

Yang *et al*. (2016) ศึกษากากิจกรรมของ SOD-like activities ทดสอบ antimutagenicity และองค์ประกอบสารอาหาร เช่น phenolic compound, flavonoid, β-1,3-D-glucan และพอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ด *P. igniarius* และเห็ด *P. linteus* สามารถสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน ได้แก่ สารสกัด 2 ชนิด คือ WEPI และ WEPL ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า WEPI มีค่า phenolic compound, flavonoid, พอลิแซ็กคาไรด์ และ SOD-like activities ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า WEPL สำหรับการวิเคราะห์หา β-1,3-D-glucan ทำได้โดยวิธี aniline blue พบว่า WEPL มีค่าสูงกว่า WEPI ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหารไม่แตกต่างกันคือมีปริมาณ K และ Ca สูง และการทดสอบ antimutagenicity ทั้ง WEPI และ WEPL สามารถยับยั้งโคโลนีของเชื้อ *Salmomella typhimurium* TA98 และ *Salmomella typhimurium* TA100 และจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า *P. igniarius* มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและภูมิคุ้มกันสูงกว่า *P. linteus*

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เพื่อศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด *Phellinus* ในอาหารเหลว จากนั้นนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และคุณลักษณะทางเคมีบางประการของพอลิแซ็กคาไรด์ในเส้นใยเห็ด *Phellinus*

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

เห็ดที่ใช้ในการวิจัยจากพิพิธภัณฑ์เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.1.1 *Phellinus* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius* (MUST_7842), *P. nigricans* (MUST_7843), *P. robustus* (MUST_7844) และ *P. setulosus* (MUST_7845)

3.2 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) 0.85% Normal salin solution

2) Mc Farland standard No. 0.5

3) 5% Sodium hypochlorite

4) Methanol (merck)

5) Absolute ethanol (merck)

6) 5% DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich)

7) $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (barium chloride) (merck)

8) Gentamicin sulphate solution

9) Quercetin (Sigma-Aldrich)

10) Gallic acid (Sigma-Aldrich)

11) Ferric chlorine hexahydrate

12) Ferrous sulfate heptahydrate

13) Sodium chloride

14) Sulfuric acid (merck)

15) Sodium dodecyl sulphate (SDS)

16) Sodium carbonate anhydrous (merck)

17) 2, 2-diphenly-1-picryhydrazyl (DPPH radical) (Sigma-Aldrich)

18) Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma-Aldrich)

19) 2, 2-Phenol crystal

20) Bromophenol blue

21) 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic diammonium salt (ABTS) (Sigma-Aldrich)

22) Ammonium persulfate

23) 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

24) 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

25) Malt extract

26) Yeast extract

27) Peptone

28) Glucose

29) Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4) (merck)

30) Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) (merck)

31) Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (merck)

3.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1) เครื่องชั่งสาร (Balance)

2) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)

3) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

4) ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar airflow cabinet)

5) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)

6) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

7) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

8) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Controller incubator Shaker)

9) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

10) เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (UV-VIS spectrophotometer, Microplate reader, FT-IR spectrometer)

11) Micropipette ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

12) เครื่องฟรีซดราย (Freeze dry)

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) ไม้พันสำลี (swab)
2) จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
3) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
4) กระบอกตวง (Cylinder)
5) Cork borer No.6
6) กระบอกฉีดยา
7) ตะเกียงแอลกอฮอล์
8) กรวยแก้ว
9) บีกเกอร์ (Beaker)
10) ปิเปต (Pipette)
11) บีกเกอร์สแตนเลส
12) ลูป (Loop)
14) หัวกรองฆ่าเชื้อ Whatman 0.45 µm
16) หลอดทดลอง
17) ไมโครปิเปต (Mricropipette)
18) คีมคีบ (Forceps)
19) ถุงพลาสติกและหนังยาง
20) เวอร์เนียร์คาลิฟเปอร์ (vernier caliper)
21) ตู้เขี่ยเชื้อ

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

1) *Escherichia coli* ATCC 25922
2) *Bacillus cereus* ATCC 11778
3) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST20625
5) *Pseudomonas aeruginosa* DMST 4739
6) *Proteus mirabilis* TISTR 100

7) *Salmonella typhimurium* TISTR 1471

8) *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518

9) *Candida albicans* TISTR 5779

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) Nutrient Broth (NB) (Himedia)

2) Nutrient Agar (NA) (Himedia)

3) Muller Hinton agar (MHA) (Himedia)

4) Potato dextrose agar (PDA) (Himedia)

5) Sabouraud Dextrose broth (SDB) (Himedia)

6) Sabouraud Dextrose agar (SDA) (Himedia)

3.5 ยาปฏิชีวนะ

1) Gentamycin (T.P. drug labolatories) ความเข้มข้น 40 µg/ml (ใช้เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย)

2) Tetracycline ความเข้มข้น 20 µg/ml (ใช้เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย)

3) Ketoconazole (Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 640 µg/ml (ใช้เป็น positive control สำหรับเชื้อยีสต์)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากเห็ด *Phellinus* spp.

นำเห็ด *Phellinus* spp. ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปแช่ 5% Sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำมาบน Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเส้นใยเจริญ จากนั้นทำการตัดเส้นใยลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจนเส้นใยเจริญเต็มจานเพาะเชื้อได้เส้นใยบริสุทธิ์สำหรับการศึกษาต่อไป

3.6.2 การจัดจำแนกเห็ด *Phellinus* spp.

3.6.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA)

เตรียมดีเอ็นเอ โดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยลงในอาหารเหลว PDB บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 วัน จากนั้นกรองและบดเส้นใยให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเส้นใยที่บดละเอียดปริมาณ 40 มิลลิกรัม มาสกัด genomic DNA โดยใช้ Genomic DNA Extraction Mini kit (RBC

Bioscience, Taiwan) ตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดย agarose gel electrophoresis บน agarose gel 1% ใน TBE (Tris-HCl, Boric acid, EDTA)

3.6.2.2 การเพิ่มปริมาณ ITS1 และ ITS4 ของยีน rDNA โดยปฏิกิริยา PCR

ตามวิธีการของ Wagner & Fischer (2002) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน nuclear encode โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน internal transcribed spacer (ITS) region มีความยาวประมาณ 650-750 bp โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGCAAGTAA-3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') โดยชุด PCR (ปริมาตรรวม 25 µl) ซึ่งประกอบด้วย 2.50 µl PCR 10x buffer, 1.0 µl $MgCl_2$ (2.5mM), 2.5 µl primers, 0.5 µl dNTPs (10 mM), 0.25 µl *Tag polymerase* และ genomic DNA ปริมาตรที่เหมาะสม และปรับปริมาตรให้ได้ 25 µl ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ขั้นตอนถัดไปทำปฏิกิริยา PCR ภายในเครื่อง Thermal cycle โดยใช้โปรแกรมอุณหภูมิรอบที่ 1 : 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที รอบที่ 2 - 35 รอบ : 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที, 55 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และรอบสุดท้าย : 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที (White 1990; Jeong *et al*., 2005)

3.6.2.3 การหาลำดับเบส และการวิเคราะห์ยีน

นำผลผลิต PCR ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction kit (RBC BIOSCIENCE, Taiwan) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen (Seoul, Korea) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 10 เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genblank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.6.3 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด (Inoculum)

นำเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 3.6.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยวางลงจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.6.4 การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

นำเส้นใยเห็ดที่ได้จากการเตรียมในหัวข้อ 3.6.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Malt Peptone (PMP), Glucose Yeast Extract 1 (GY1) และ Glucose Yeast Extract 2 (GY2) ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 (Wang *et al*., 2014) โดยวางตรงกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อทำการทดลองสูตรอาหารละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญของเส้นใยที่เจริญแผ่ออกไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.5 การสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

3.6.5.1 เส้นใย (Mycelium)

นำเส้นใยเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยน้ำร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอล อัตราส่วนสารตัวอย่างต่อเอทานอลเท่ากับ 1:4 (v/v) ตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนที่เป็นตะกอนล้างด้วยเอทานอลเข้มข้นและปั่นเหวี่ยงอีกรอบ ทำให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไปได้ (Lee *et al*., 2003)

3.6.5.2 เห็ด (Fruiting bodies)

นำดอกเห็ดมาบดสกัดด้วยน้ำร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นอีก 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีและกรอง แล้วนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทานอล อัตราส่วนสารตัวอย่างต่อเอทานอล เท่ากับ 1:4 (v/v) ตามลำดับ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตะกอนที่ได้นำมาล้างด้วยเอทานอลและปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง ทำให้แห้งได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.6.6 การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม

นำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี phenol sulfuric acid (Dubuis *et al*., 1956) ตามวิธีการดัดแปลง Mazuko และคณะ (2005) ซึ่งใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม 5% phenol จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็ว ใส่กรดซัลฟิวริก 5 มิลลิลิตร ทันทีตั้งทิ้งไว้ในให้สารทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง นำไปบ่มในอ่างน้ำ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 490 นาโนเมตร บันทึกผลและใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน นำไปคำนวณหาค่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (g/l) (ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm x อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน x 1000}}$$

3.6.7 การหาปริมาณ Total phenolic content (TPC)

การตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลิก โดยวิธีดัดแปลงตาม Singleton และคณะ (1995) เตรียมสารละลาย gallic acid 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ methanol

เป็นตัวทำละลาย เติมสารละลายโฟลิน-ซิโอเคาทูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu's reagent) ทำการเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (w/v) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัดแห้งปริมาณ 1 กรัม (mg GAE/กรัมสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์)

3.6.8 การหาปริมาณ Total flavonoid content (TFC)

ดัดแปลงตามวิธีของ Kamtekar และคณะ (2014) สารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1M NaOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ใช้เคอร์ซิตินเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซิติน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบแห้งปริมาณ 1 กรัม (mg QE/กรัมสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์)

3.6.9 การหาปริมาณโปรตีน (Protein content)

ดัดแปลงวิธี Bradford (1976) โดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง 10-50 ไมโครลิตร ผสมกับโปรตีน (Bio-Rad) 200 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสง 590 นาโนเมตร ใช้ sample buffer เป็น blank นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงมาคำนวณโปรตีนโดยเทียบกับสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

3.6.10 FT-IR spectroscopy

ในการวิเคราะห์ใช้เครื่อง ATR-FTIR spectrophotometer โดยนำสารสกัดแห้ง 2 มิลลิกรัมวางลงบนแท่นวางของเครื่อง จากนั้นทำการตั้งค่าการสแกนตั้งแต่ 4000 - 400 cm^{-1} โดยระบุชื่อตัวอย่างแต่ละชนิด เครื่องจะทำการวัดและบันทึกผล และนำผลสเปคตรัมที่ได้มาวิเคราะห์ต่อไป (Jourauphy *et al*., 2008)

3.6.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.11.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล ในสารละลาย absolute methanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลาย DPPH และสารสกัดตัวอย่างผสมให้เข้ากันโดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 ไมโครลิตร ดัดแปลงตามวิธี Wang และคณะ (2014) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จำนวนทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตร

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [\,(A_0-A_s)/A_0\,] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์

3.6.11.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay

ตามวิธีการดัดแปลง Wang และคณะ (2014) เตรียมสารละลาย ABTS 7 มิลลิโมล ผสมกับ 2.4 มิลลิโมล $K_2S_2O_8$ (Potassium persulfate) แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นจะได้ $ABTS^{\bullet+}$ นำไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นเตรียมสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 0.1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ 900 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องมืด เวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตร

$$\text{ABTS radical scavenging \%} = [\,(A_0-A_s)/A_0\,] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

3.6.11.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay

ดัดแปลงตามวิธีการของ Benzie & Strain (1999) เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสม acetate buffer 300 มิลลิโมล (pH 3.6), 20 มิลลิโมล Ferric chloride solution ($FeCl_3 \cdot H_2O$) และ 10 มิลลิโมล TPTZ (2,4,6-trispyridyl-s-triazine) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 สารสกัดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent 950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จำนวนทดลอง 3 ซ้ำ เตรียมสารละลาย $FeSO_4$ เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100-1000 ไมโครโมล นำไปคำนวณหา FRAP value (µmole Fe^{2+}/กรัมสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์) (Wang *et al*., 2014)

3.6.12 การศึกษาสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรคในมนุษย์ ด้วยวิธี Agar well diffusion

ทำโดยใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ที่เตรียมไว้ โดยเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยสารละลาย Normal saline solution (0.85%) ปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland Standard No. 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml) และเจือจางยีสต์ด้วยสารละลาย Normal saline solution (0.85%) ปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland Standard No. 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml) จากนั้นทำการป้าย (swab) ลงจานอาหาร MHA และ SDA ตามลำดับ (เชื้อ 1 สายพันธุ์ต่อ 1 จานอาหาร) ทำเชื้อละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion หยดสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) โดยใช้ positive control คือ Gentamycin และ Tetracycline ตามลำดับ และใช้ 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็น negative control บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยดูบริเวณที่มีการยับยั้ง (Inhibition zone) ของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (หน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร) (Balouiri *et al*., 2016)

3.6.13 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ (MBC) โดยวิธี Broth microdilution

โดยการทำ Broth microdilution test ทดสอบใน microtiter plate 96 well โดยใช้อาหารเหลว 50 มิลลิลิตรต่อหลุม เจือจางสารสกัดทดสอบแบบ two fold dilution เจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยสารละลาย Normal saline solution (0.85%) ปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland Standard No. 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^8 CFU/ml) และเจือจางยีสต์ด้วยสารละลาย Normal saline solution (0.85%) ปรับให้มีความขุ่นใกล้เคียงกับ McFarland Standard No. 0.5 (เชื้อประมาณ 1.5 x 10^6 CFU/ml) จากนั้นเติมเชื้อที่เจือจางแล้ว 50 ไมโครลิตร ในอาหารเหลวที่มีสารสกัดทดสอบเจือจางอยู่ โดย positive control คือหลุมที่มีเชื้อและยา gentamycin และ tetracycline ตามลำดับ และ negative control คือหลุมมีเชื้อและอาหารเหลวปราศจากสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยการเติม resazurin ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของ resazurin หากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจะแสดงให้เห็นสีน้ำเงินของ resazurin และถ้าเชื้อยังสามารถเจริญได้ resazurin จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู การทดสอบคาความเขมขนต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) ทำตอเนื่องจากการหาคา MIC โดยวิธี drop plate นำสารละลายหลุมที่ใหผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากการหาคา MIC มาหยดลงบนอาหาร NA ปริมาตรจุดละ 10 ไมโครลิตร บมที่ 37 องศาเซลเซียส เปนเวลา 24 ชั่วโมง อานค่าความเขมขนต่ำสุดที่สามารถฆาแบคทีเรียได้(ดัดแปลงมาจาก National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2008)

3.6.14 ทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxic effect) ต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

นำ cell culture มาทดสอบ โดยเซลล์ที่ใช้ได้แก่ มะเร็งเต้านม (MDA-MD-231) และมะเร็งตับ (HepG2) ตามวิธี Gao และคณะ (2013) ทดสอบใน 96-well microtiter plate ความหนาแน่น 1x10^4 cell/well ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผสมสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 10 - 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติม colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง เกิดผลึก formazan นำมาละลายด้วยไอโซโพรนอลในกรดไฮโดรคลอริก นำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงความยาว 540 นาโนเมตร ในเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงคำนวณตามสูตร (Li *et al*., 2015)

จำนวนเซลล์รอดชีวิต (%) = $\frac{\text{สารตัวอย่าง+อาหารเลี้ยงเซลล์+เซลล์ – อาหารเลี้ยงเซลล์+สารตัวอย่าง}}{}$ x 100

อาหารเลี้ยงเซลล์+เซลล์ - อาหารเลี้ยงเซลล์+สารตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลเป็นค่า mean ± SD และวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ค่า $p<0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยใช้ One-way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (Post hoc test) โดยเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparison) โดยวิธี Turkey's HSD ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus* spp. ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการวิจัยตามลำดับดังนี้

4.1 การจำแนกเห็ดโดยใชขอมูลทางพันธุกรรม

4.2 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

4.3 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณน้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

4.4 วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

.

4.1 การจำแนกเห็ดโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากการคัดเลือกเห็ด สามารถจำแนกชนิดของเห็ดโดยเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของribosomal DNA (rDNA) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เมื่อเปรียบเทียบฐานข้อมูลจาก GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่า *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีลำดับคู่เบสประมาณ 718, 739, 771 และ 789 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ 98.47, 99.72, 99.21 และ 97.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 4.1) และแสดงการทำ phylogenetic tree (ภาพภาคผนวก ค.3)

ตาราง 4.1 ผลการศึกษาค่าผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI)

ไอโซเลต	Match	Accession number	Bits (score)	bps	Similarity (%)
MUST_7842	*Phellinus igniarius*	MF782801.1	1264 (684)	718	98.47
MUST_7843	*Phellinus nigricans*	MF319077.1	1332 (721)	739	99.72
MUST_7844	*Phellinus robustus*	JQ087892.1	1365 (739)	771	99.21
MUST_7845	*Phellinus setulosus*	KU954536.1	1229 (665)	789	97.14

4.2 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

4.2.1 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

จากผลการศึกษา พบว่าเส้นใยเห็ด *P. igniarius, P. nigricans* และ *P. robustus* เจริญได้ดีบนอาหารแข็ง PMP, GY1 และ GY2 และเห็ด *P. setulosus* เจริญได้ดีถึงปานกลางบนอาหารแข็งทั้ง 3 ชนิด ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ดังนั้นจึงเพาะเลี้ยงเห็ด *Phellinus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารเหลว PMP, GY1 และ GY2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะเขย่าด้วย

ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (ตาราง 4.2) พบว่าเห็ด *P. igniarius* เจริญได้ดีในอาหาร GY2 ให้น้ำหนักเส้นใยสูงที่สุด (11.78 ± 3.09 กรัมต่อลิตร) และรองลงมา GY1 และ PMP (11.54 ± 3.18 และ 7.14 ± 2.55 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ในอาหาร GY1 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (23.50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหาร PMP และ GY2 (17 และ 14.50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบสูงที่สุดในอาหาร GY2 (367.60 ± 39.84 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) และรองลงมาคืออาหาร GY1 และ PMP (321.80 ± 39.39 และ 187.40 ± 23.74 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ

เห็ด *P. nigricans* เจริญได้ดีในอาหาร GY2 ให้น้ำหนักเส้นใยสูงที่สุด (11.74 ± 3.42 กรัมต่อลิตร) และรองลงมาคืออาหาร PMP และ GY1 (10.74 ± 1.56 และ 8.52 ± 2.77 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ในอาหาร GY2 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (19.50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหาร GY1, PMP (17.50 และ 15.00 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบสูงที่สุดในอาหาร GY2 (557.33 ± 20.50 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคืออาหาร GY1 และ PMP (491.00 ± 14.73 และ 438.00 ± 9.45 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ

เห็ด *P. robustus* เจริญได้ดีในอาหาร GY2 ให้น้ำหนักเส้นสูงที่สุด (10.30 ± 4.15 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคืออาหาร PMP และ GY1 (8.80 ± 2.33 และ 8.50 ± 2.94 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ในอาหาร GY2 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (10.50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหาร GY1 และ PMP (7.00 และ 6.00 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบสูงที่สุดในอาหาร GY1 (524.66 ± 57.91 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) และรองลงมาคืออาหาร GY2 และ PMP (471.94 ± 37.78 และ 443.60 ± 34.68 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ

เห็ด *P. setulosus* เจริญได้ดีในอาหาร GY1 ให้น้ำหนักเส้นใยสูงที่สุด (7.97 ± 2.72 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคืออาหาร PMP และ GY2 (6.32 ± 3.56 และ 5.75 ± 2.17 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ในอาหาร GY2 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (16.00 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคืออาหาร GY1 และ PMP (15.50 และ 6.00 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบสูงที่สุดในอาหาร GY1 (556.40 ± 6.43 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด

หยาบ) รองลงมาคืออาหาร GY2 และ PMP (421.22 ± 12.13 และ 316.20 ± 9.07 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ

ตาราง 4.2 น้ำหนักแห้ง ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว 3 สูตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า 125 รอบต่อนาที และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน

ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหนักแห้ง* ของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์* รวม (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
P. igniarius			
PMP	7.14 ± 2.55^{b}	17.00	187.40 ± 23.74^{c}
GY1	11.54 ± 3.18^{a}	23.50	321.80 ± 39.39^{b}
GY2	11.78 ± 3.09^{a}	14.50	367.60 ± 39.84^{b}
P. nigricans			
PMP	10.74 ± 1.56^{a}	15.00	438.00 ± 9.45^{b}
GY1	8.52 ± 2.77^{b}	17.50	491.00 ± 14.73^{a}
GY2	11.74 ± 3.42^{a}	19.50	557.33 ± 20.50^{a}
P. robustus			
PMP	8.80 ± 2.33^{b}	6.00	443.60 ± 34.68^{b}
GY1	8.50 ± 2.94^{b}	7.00	524.66 ± 57.91^{a}

GY2	10.30 ± 4.15[a]	10.50	471.94 ± 37.78[a]
P. setulosus			
PMP	6.32 ± 3.56[c]	6.00	316.20 ± 9.07[b]
GY1	7.97 ± 2.72[b]	15.50	556.40 ± 6.43[a]
GY2	5.75 ± 2.17[c]	16.00	421.22 ± 12.13[b]

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b และ c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

จากผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักแห้งของเส้นใยและพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้ชนิดอาหารที่เหมาะสมคือ อาหาร GY1 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อเห็ด *P. setulosus* และอาหาร GY2 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อเห็ด *P. igniarius, P. nigricans* และ *P. robustus* สำหรับเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว ศึกษาองค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อไป

4.3 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณน้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

4.3.1 ปริมาณน้ำหนักแห้งสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

นำเส้นใยเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเหมาะสมคือ GY2 และ *P. setulosus* เพาะเลี้ยงในอาหาร GY1 ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ระยะเวลา 30 วัน วิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเส้นใย และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม พบว่า *P. igniarius* ให้น้ำหนักแห้งเส้นใยสูงที่สุด (11.32 ± 5.12 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (10.74 ± 3.99, 10.20 ± 4.04 และ 9.25 ± 5.76 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ นอกจากนี้ *P. igniarius* ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (19.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ

P. nigricans, *P. robustus* และ *P. setulosus* (16.05, 14.75 และ13.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบสูงที่สุดในเห็ด *P. igniarius* (798.81 ± 26.30 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือ *P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus* (707.85 ± 21.55, 685.48 ± 23.07 และ 360.24 ± 37.78 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ (ตาราง 4.3)

ตาราง 4.3 น้ำหนักแห้งของเส้นใย ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์รวมของเส้นใยเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเหมาะสม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 30 วัน

ตัวอย่าง	น้ำหนักแห้ง* ของเส้นใย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์หยาบ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม* (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
P. igniarius	11.32 ± 5.12[a]	19.05	798.81 ± 26.30[a]
P. nigricans	10.20 ± 4.04[a]	16.05	707.85 ± 21.55[b]
P. robustus	10.74 ± 3.99[a]	14.75	685.48 ± 23.07[b]
P. setulosus	9.25 ± 5.76[b]	13.20	360.24 ± 37.78[c]

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b และ c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

4.3.2 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *Phellinus* spp.

จากการนำดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มาวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์รวม พบว่า *P. igniarius* ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (9.00 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (7.00, 6.28 และ 3.68 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ สำหรับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบมาก

ที่สุดคือ *P. robustus* (705.24 ± 25.42 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือ *P. igniarius, P. nigricans* และ *P. setulosus* (688.73 ± 18.69, 448.33 ± 11.44, 261.19 ± 4.00 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ (ตาราง 4.4)

ตาราง 4.4 ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณรวมพอลิแซ็กคาไรด์รวม* (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
P. igniarius	9.00	688.73 ± 18.69[a]
P. nigricans	7.00	448.33 ± 11.44[b]
P. robustus	6.28	705.24 ± 25.42[a]
P. setulosus	3.68	261.19 ± 04.00[c]

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b, c และ d ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันตัวในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

4.3 วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

จากการทดสอบหาปริมาณอลิกรวมในสารสกัดหยาบของเส้นใยและดอกของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 17.044x$ และ $R^2 = 0.999$) พบปริมาณฟีนอลิกแตกต่างกัน (ตาราง 4.5) สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยพบว่าเห็ด *P. igniarius* มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (97.76 ± 2.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือเส้นใยเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ

P. setulosus (75.54 ± 2.86, 55.40 ± 0.45 และ 47.88 ± 2.29 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (93.60 ± 0.41 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (73.40 ± 0.51 53.00 ± 0.29 และ 45.00 ± 0.41 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมระหว่างเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าในดอกเห็ด

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

จากการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบของเส้นใยและดอกของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์ซิติน ($y = 0.513x$ และ $R^2 = 0.993$) พบปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน (ตาราง 4.5) ในสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (271.32 ± 1.16 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาเส้นใย *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (178.14 ± 2.87, 165.56 ± 2.29 และ 123.84 ± 1.58 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ และในสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (300.80 ± 1.17 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาดอกเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (195.60 ± 1.19, 176.80 ± 1.19 และ 120.80 ± 0.8 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ

ตาราง 4.5 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์

	เชื้อ	ปริมาณฟีนอลิกรวม* (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม* (มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
เส้นใย	*P. igniarius*	97.76 ± 2.20^{a}	271.32 ± 1.16^{b}
	P. nigricans	75.54 ± 2.86^{c}	178.14 ± 2.87^{d}
	P. robustus	55.40 ± 0.45^{d}	165.56 ± 2.29^{d}
	P. setulosus	47.88 ± 2.29^{e}	123.84 ± 1.58^{e}
ดอก	*P. igniarius*	93.60 ± 0.41^{b}	300.80 ± 1.17^{a}
	P. nigricans	73.40 ± 0.51^{c}	195.60 ± 1.19^{c}

P. robustus	53.00 ± 0.29[d]	176.80 ± 1.19[d]
P. setulosus	45.00 ± 0.41[e]	120.80 ± 0.81[e]

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b, c, d และ e ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

4.3.3 ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมโดยดัดแปลงวิธี Bradford ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุดในเส้นใยเห็ด *P. igniarius* (14.71 ± 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (12.35 ± 0.32, 12.69 ± 0.44 และ 10.95 ± 1.78 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ สำหรับปริมาณโปรตีนรวมจากดอกเห็ด พบดอกเห็ด *P. igniarius* มีปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุด (38.77 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือเห็ด *P. robustus*, *P. nigricans* และ *P. setulosus* (35.00 ± 0.47, 28.66 ± 0.24 และ 14.78 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ (ตาราง 4.6) และทำการทดลองด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพผนวก ค.2)

ตาราง 4.6 ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์

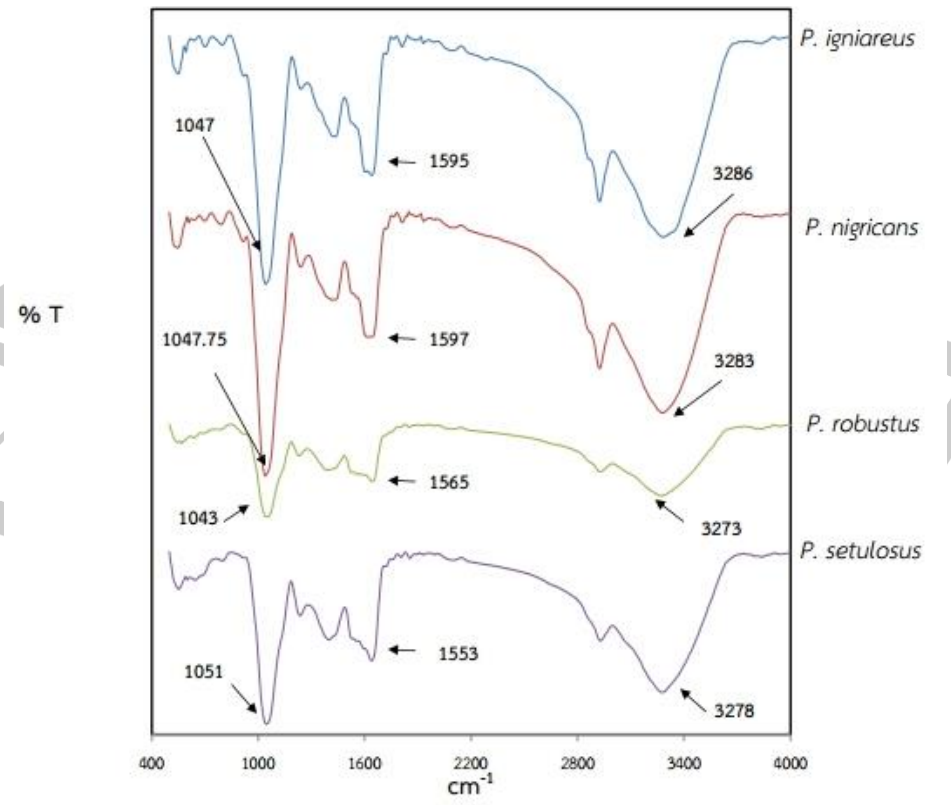
ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีนรวมเส้นใย* (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ)	ปริมาณโปรตีนรวมดอกเห็ด* (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
P. igniarius	14.71 ± 1.55[a]	38.77 ± 0.33[a]
P. nigricans	12.35 ± 0.32[b]	28.66 ± 0.24[b]
P. robustus	12.69 ± 0.44[b]	35.00 ± 0.47[a]
P. setulosus	10.95 ± 1.78[b]	14.78 ± 0.19[c]

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

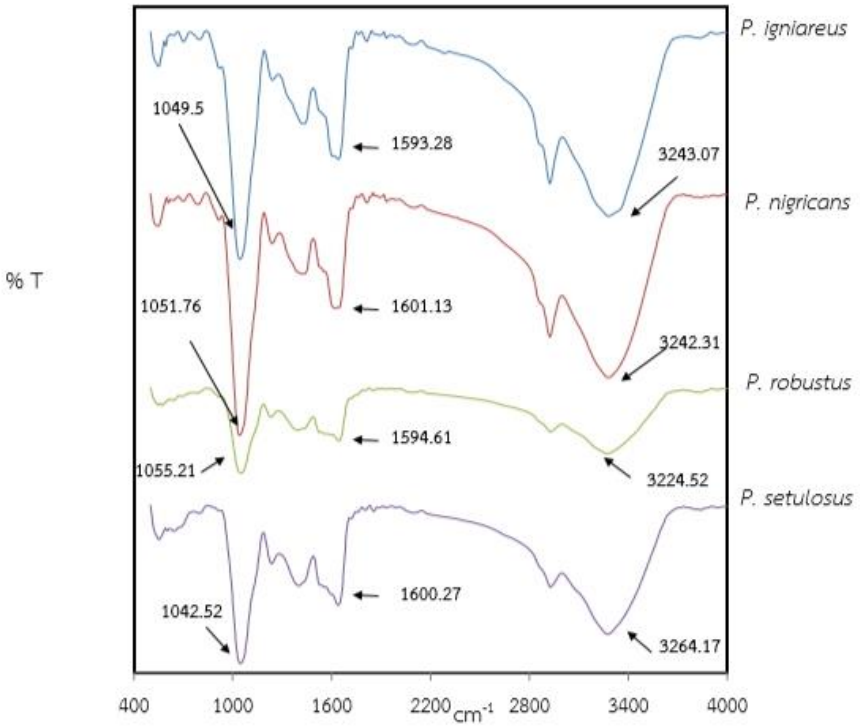
* a, b และ c ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

4.3.4 การวิเคราะห์ FTIR

จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์ ด้วย FTIR เพื่อยืนยันสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในสารสกัดพบว่า สารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์ ดูดกลืนแสงได้หลายตำแหน่ง (ภาพประกอบ 4.1) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 3286-3273 cm^{-1}, 1597-1553 cm^{-1} และ 1051-1043 cm^{-1} และสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดมีค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่ง 3267-3224 cm^{-1}, 1601-1593 cm^{-1} และ 1055-1042 cm^{-1} (ภาพประกอบ 4.2) ซึ่งช่วงความยาวคลื่นประมาณ 3390-2920 cm^{-1} เป็นตำแหน่งของ O-H stretching และ C-H stretching ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 1600-1417 cm^{-1} เป็นตำแหน่งของ COO^- (carboxylic group) และ -CONH- group (Liu *et al*., 2016) และช่วงความยาวคลื่นประมาณ 1000-1200 cm^{-1} เป็นตำแหน่งของ C-O-C stretching และ C-OH side group (Wang *et al*., 2015)



ภาพประกอบ 4.1 FTIR Spectra ของเส้นใยเห็ด *P. igniarius, P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus*



ภาพประกอบ 4.2 FTIR Spectra ของดอกเห็ด *P. igniarius, P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus*

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.1 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.4.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีมาตรฐาน DPPH พบว่าฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันคือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 4.3) ซึ่งสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด พบว่าเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ สูงที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 62.45 ± 0.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเส้นใยเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 78.19 ± 2.54, 327.87 ± 0.67 และ 398.44 ± 1.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 4.7 และภาพประกอบ 4.3 ก)

จากผลฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด พบว่าเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 64.27 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือดอกเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 139.38 ± 0.72, 400.32 ± 0.65 และ 409.50 ± 0.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 4.7 และ ภาพประกอบ 4.3 ข)

4.4.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกของเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ด้วยวิธีมาตรฐาน ABTS พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันคือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 4.4) ซึ่งสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ สูงที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 27.24 ± 0.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเห็ด *P. nigricans*, *P.*

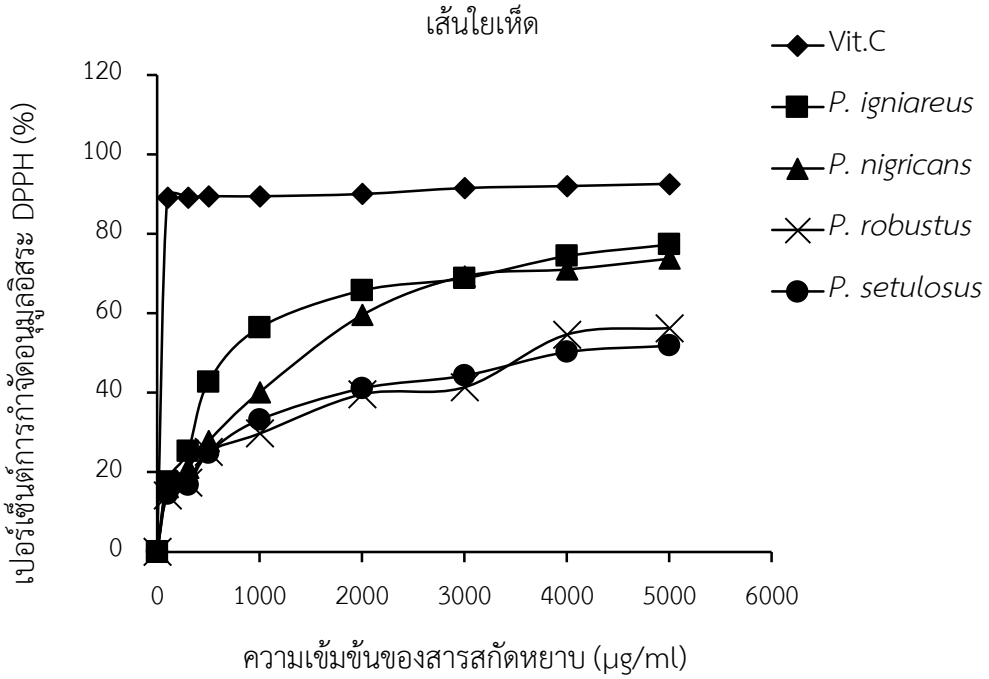
robustus และ *P. setulosus* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.72 ± 1.17, 52.84 ± 0.44 และ 60.97 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 4.7 และ ภาพประกอบ 4.4 ก)

จากผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ ของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด พบว่าเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet}$ สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.06 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.32 ± 0.16, 53.43 ± 0.20 และ 62.94 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตาราง 4.7 และ ภาพประกอบ 4.4 ข)

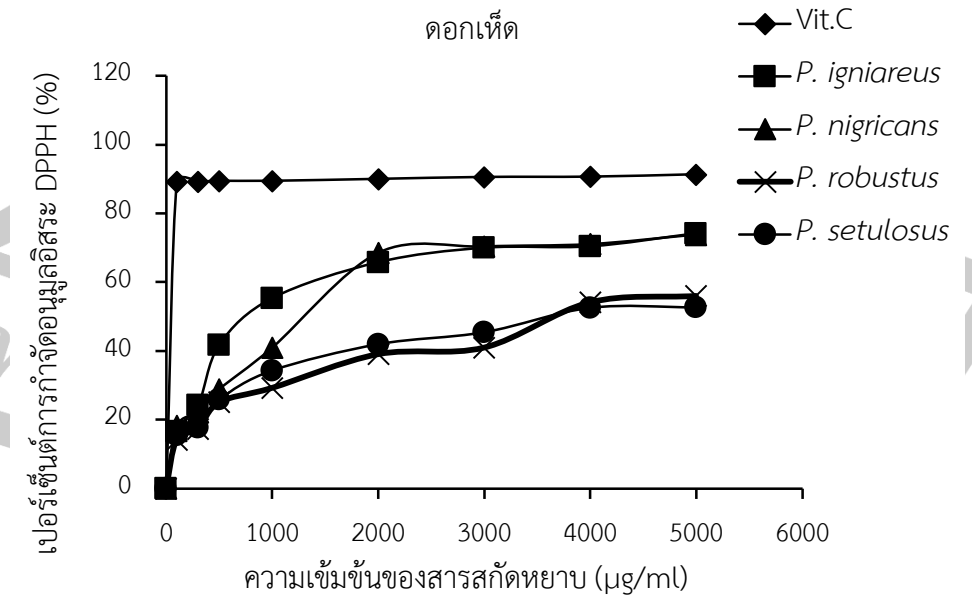
4.4.1.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ผลการตรวจสอบฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดหยาบเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด (119.73 ± 1.63 ไมโครโมล Fe^{2+}equivalents ต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาเส้นใยเห็ด *P. nigricans, P. robustus* และ *P. setulosus* (95.39 ± 2.56, 89.21 ± 1.73 และ 71.68 ± 1.18 ไมโครโมล Fe^{2+}equivalents ต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด พบว่าเห็ด *P. igniareus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (113.80 ± 1.94 ไมโครโมล Fe^{2+}equivalents ต่อกรัมสารสกัดหยาบ) รองลงมาคือดอกเห็ด *P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* (94.60 ± 1.66, 90.80 ± 1.70 และ 69.40 ± 2.03 ไมโครโมล Fe^{2+}equivalents ต่อกรัมสารสกัดหยาบ) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ระหว่างเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* พบว่าเส้นใยเห็ด *P. igniarius* และ *P. setulosus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีสูงกว่าดอกเห็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในเห็ด *P. nigricans* และ *P. robustus* (ตาราง 4.7)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว


เส้นใยเห็ด
Vit.C
P. igniareus
P. nigricans
P. robustus
P. setulosus
เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/ml)

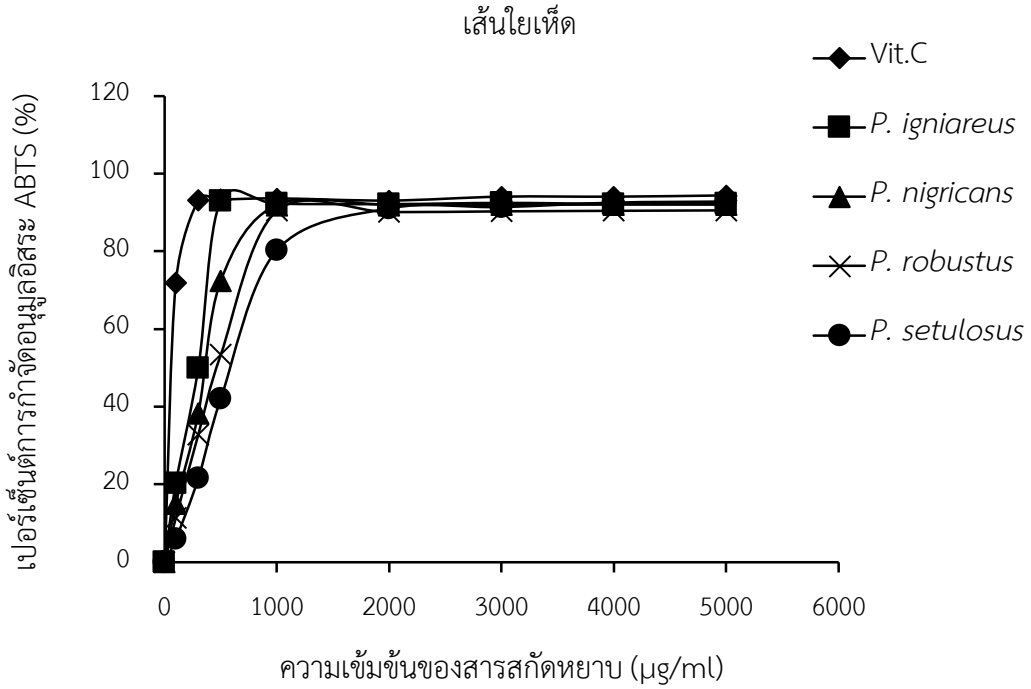
(ก)

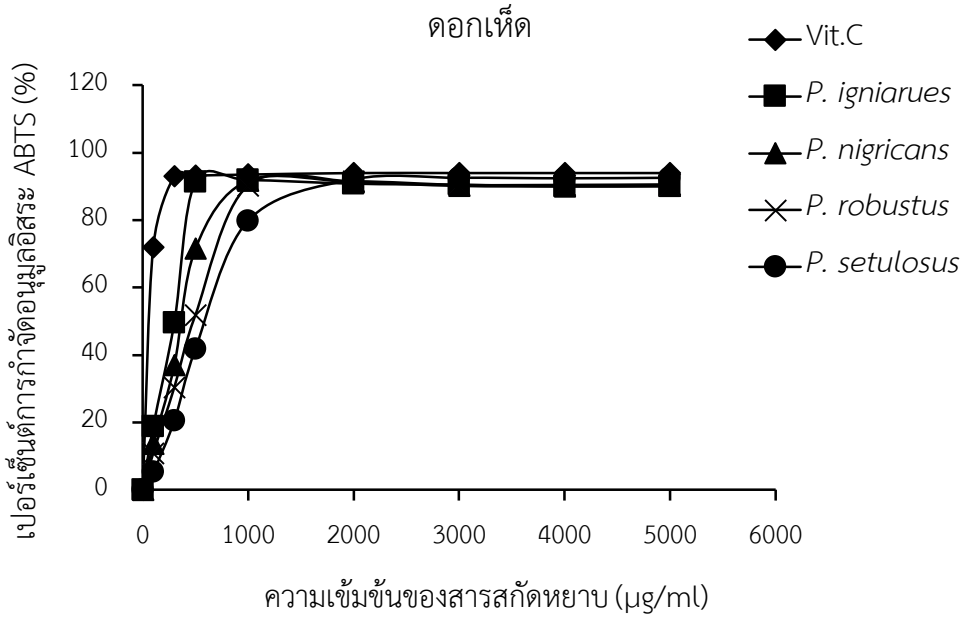

ดอกเห็ด
Vit.C
P. igniareus
P. nigricans
P. robustus
P. setulosus
เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (µg/ml)

(ข)

ภาพประกอบ 4.3 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) *Phellinus spp.*

(ก)





(ข)

ภาพประกอบ 4.4 เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS• ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข) *Phellinus spp.*

ตาราง 4.7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP จากสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

	เชื้อ	DPPH* (IC_{50}) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ABTS* (IC_{50}) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	FRAP value* (ไมโครโมล Fe^{2+}equivalents ต่อกรัมสารสกัดหยาบ)
เส้นใย	*P. igniarius*	62.45 ± 0.96^{b}	27.24 ± 0.76^{b}	119.73 ± 1.63^{a}
	P. nigricans	78.19 ± 2.54^{c}	50.72 ± 1.17^{c}	95.39 ± 2.56^{c}
	P. robustus	327.87 ± 0.67^{e}	52.84 ± 0.44^{c}	89.21 ± 1.73^{d}
	P. setulosus	398.44 ± 1.52^{e}	60.97 ± 0.35^{d}	71.68 ± 1.18^{f}
ดอก	*P. igniarius*	64.27 ± 0.18^{b}	28.06 ± 0.17^{b}	113.80 ± 1.94^{b}
	P. nigricans	136.38 ± 0.72^{d}	36.32 ± 0.16^{b}	94.60 ± 1.66^{c}
	P. robustus	400.32 ± 0.65^{f}	53.43 ± 0.20^{c}	90.80 ± 1.70^{d}
	P. setulosus	409.50 ± 0.54^{f}	62.94 ± 0.35^{d}	69.40 ± 2.03^{g}
std. vitamin c		2.74 ± 0.14^{a}	3.79 ± 0.19^{a}	

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b, c, d, e, f และ g ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

4.4.1.4 การหาค่าสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยและดอกเห็ด

เมื่อนำข้อมูลจากการทดลองมาสร้างกราฟเพื่อประเมินหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระทำการวิเคราะห์ความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระโดยวิธีมาตรฐาน DPPH, ABTS และกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระทำการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP กับปริมาณของฟีนอลิกรวม (TPC) และปริมาณฟลาโวนอยด์

รวม (TFC) มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (ตามตาราง 4.8) จากเส้นใยเห็ดพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และ ABTS พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงซึ่งโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.993 หมายความว่าฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และ ABTS จะมีค่าสอดคล้องกัน นอกจากนี้ยังแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.968 และ -0.959 ตามลำดับหมายความว่าหากมีปริมาณ TPC และ TFC มากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH จะมีค่าความสอดคล้องกันแบบแปรผกผัน และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.715 หมายความว่าหากมีปริมาณ พอลิแซ็กคาไรด์รวมมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH จะมีประสิทธิภาพดี

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างว่าค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน ABTS และปริมาณ TPC, TFC จะพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.974 และ -0.966 ตามลำดับ หมายความว่าหากมีปริมาณ TPC และ TFC มากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จะมีประสิทธิภาพ และพบค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC และ TFC มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.942 หมายความว่าหากมีปริมาณ TPC มากจะพบว่าปริมาณ TFC มากขึ้นด้วย และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน ABTS และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.758 หมายความว่าหากมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จะมีประสิทธิภาพดี

ผลค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH, ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.245 และ -0.453 ตามลำดับ หมายความว่าหากสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP มากฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และ ABTS จะมีประสิทธิภาพดี ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP และปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.451 และ 0.338 หมายความว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์สูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพการต้าน

อนุมูลอิสระ (FRAP) สูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการจับกับอนุมูลอิสระเพื่อหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP และ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.245 หมายความว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) สูงขึ้นด้วย และผลค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมและและปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.915 และ 0.906 หมายความว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์สูงจะส่งผลให้มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงขึ้น (ตาราง 4.8)

จากดอกเห็ดพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และ ABTS พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงซึ่งโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.985 หมายความว่าฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และ ABTS จะมีประสิทธิภาพดี นอกจากนี้ยังแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.958 และ -0.915 ตามลำดับหมายความว่าหากมีปริมาณ TPC และ TFC มากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH จะมีประสิทธิภาพดี และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.709 หมายความว่าหากมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH จะมีค่าประสิทธิภาพดี

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างว่าค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน ABTS และปริมาณ TPC, TFC จะพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.962 และ -0.923 ตามลำดับ หมายความว่าหากมีปริมาณ TPC และ TFC มากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จะมีประสิทธิภาพดี และพบค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TPC และ TFC มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.931 หมายความว่าหากมีปริมาณ TPC มากจะพบว่าปริมาณ TFC มากขึ้นด้วย และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน ABTS และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์

เท่ากับ -0.723 หมายความว่าหากมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS จะมีประสิทธิภาพดี

ผลค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของวิธีมาตรฐาน DPPH, ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.264 และ -0.366 ตามลำดับ หมายความว่าหากสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP มากฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และ ABTS จะมีประสิทธิภาพดี ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP และปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.420 และ 0.237 หมายความว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์สูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) สูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการจับกับอนุมูลอิสระเพื่อหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP และ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.238 หมายความว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงจะส่งผลให้มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) สูงขึ้นด้วย และผลค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมและและปริมาณ TPC, TFC พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูงพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.910 และ 0.901 หมายความว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์สูงจะส่งผลให้มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงตามด้วย (ตาราง 4.8)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

ตาราง 4.8 แสดงความสัมพันธ์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP กับปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจาก เส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

	ABTS	FRAP	TPC	TFC	พอลิแซ็กคาไรด์รวม
เส้นใย					
DPPH	0.993**	-0.245	-0.968**	-0.959**	-0.715**
ABTS	-	-0.453	-0.974**	-0.966**	-0.758**
FRAP	-	-	0.451	0.338	0.245
TPC	-	-	-	0.942**	0.915**
TFC	-	-	-	-	0.906**
พอลิแซ็กคาไรด์รวม	-	-	-	-	-
	ABTS	FRAP	TPC	TFC	พอลิแซ็กคาไรด์รวม
ดอกเห็ด					
DPPH	0.985**	-0.264	-0.958**	-0.912**	-0.709**
ABTS	-	-0.366	-0.962**	-0.923**	-0.723**
FRAP	-	-	0.420	0.237	0.238
TPC	-	-	-	0.931**	0.910**
TFC	-	-	-	-	0.901**
พอลิแซ็กคาไรด์รวม	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ** เหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

- คือ ไม่มีความสัมพันธ์กัน

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

4.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพก่อโรคในมนุษย์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.2.1 ผลการศึกษาสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ก่อโรคในมนุษย์ ด้วยวิธี Agar well diffusion

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ดจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะ gentamycin ที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ tetracycline ความเขมขน 20 ไมโครกรัมตอมิลลิลิตร เป็น positive control และ DMSO 5 เปอร์เซ็นต์เป็น negative control โดยดูบริเวณที่มีการยับยั้ง (Inhibition zone) การเจริญต่อเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* (ATCC 25922), *Ps. aeroginosa* (DMST 4739), *Proteus mirabilis* (TISTR 100), *S. typhimurium* (TISTR 1471), *B. cereus* (ATCC 11778), *S. aureus* (ATCC 25933), *S. aureus* (MRSA) (DMST 20625), *S. epidermidis* (TISTR 518) และยีสต์ *C. albicans* (TISTR 5779) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Proteus mirabilis*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* (ภาพภาคผนวก ค.2) แต่สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E.coli*, *Ps. Aeruginosa*, *S. typhimurium, B. cereus*, *S. aureus* (MRSA) และยีสต์ *C. albicans* ดังนี้

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. mirabilis* (TISTR 100) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. mirabilis* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยั้บยั้งเท่ากับ 17.63 ± 0.50 มิลลิเมตร รองลงมาคือเส้นใยเห็ด *P. igniarius,* ดอกเห็ด *P. nigricans* และเส้นใย *P. nigricans* (16.27 ± 0.21, 16.53 ± 0.55 และ 15.83 ± 0.68 มิลลิเมตร) ตามลำดับ พบยาปฏิชีวนะ gentamycin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 21.17 ± 0.67 มิลลิเมตร ซึ่งมีบริเวณกว้างกว่าสารกัด แต่ในสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *P. robustus* และ *P. setulosus* ไม่สามารถยับยั้ง *P. mirabilis* ได้ (ตาราง 4.9)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (ATCC 25933) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *P. nigricans* และดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด บริเวณยับยั้งเท่ากับ 17.90 ± 0.36 และ 17.73 ± 0.93 มิลลิเมตร รองลงมาคือเส้นใยเห็ด *P. igniarius, P. nigricans* และดอกเห็ด *P. robustus* (16.90 ± 0.79, 15.50 ± 0.50 และ 9.33 ± 0.21 มิลลิเมตร) ยา gentamycin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 27.40 ± 1.97 มิลลิเมตร และยา tetracycline มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 31.63 ± 0.55 มิลลิเมตร ซึ่งมีบริเวณกว้างกว่าสารสกัด (ตาราง 4.9)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR 518) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.70 ± 0.88 มิลลิเมตร รองลงมาคือดอกเห็ด *P. nigricans* และเส้นใยเห็ด *P. igniarius* (14.33 ± 0.82 และ 9.13 ± 0.59 มิลลิเมตร) ยา gentamycin มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 26.67 ± 1.89 มิลลิเมตร และยา tetracycline มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 31.69 ± 1.46 มิลลิเมตร ซึ่งมีบริเวณกว้างกว่าสารสกัด (ตาราง 4.9)

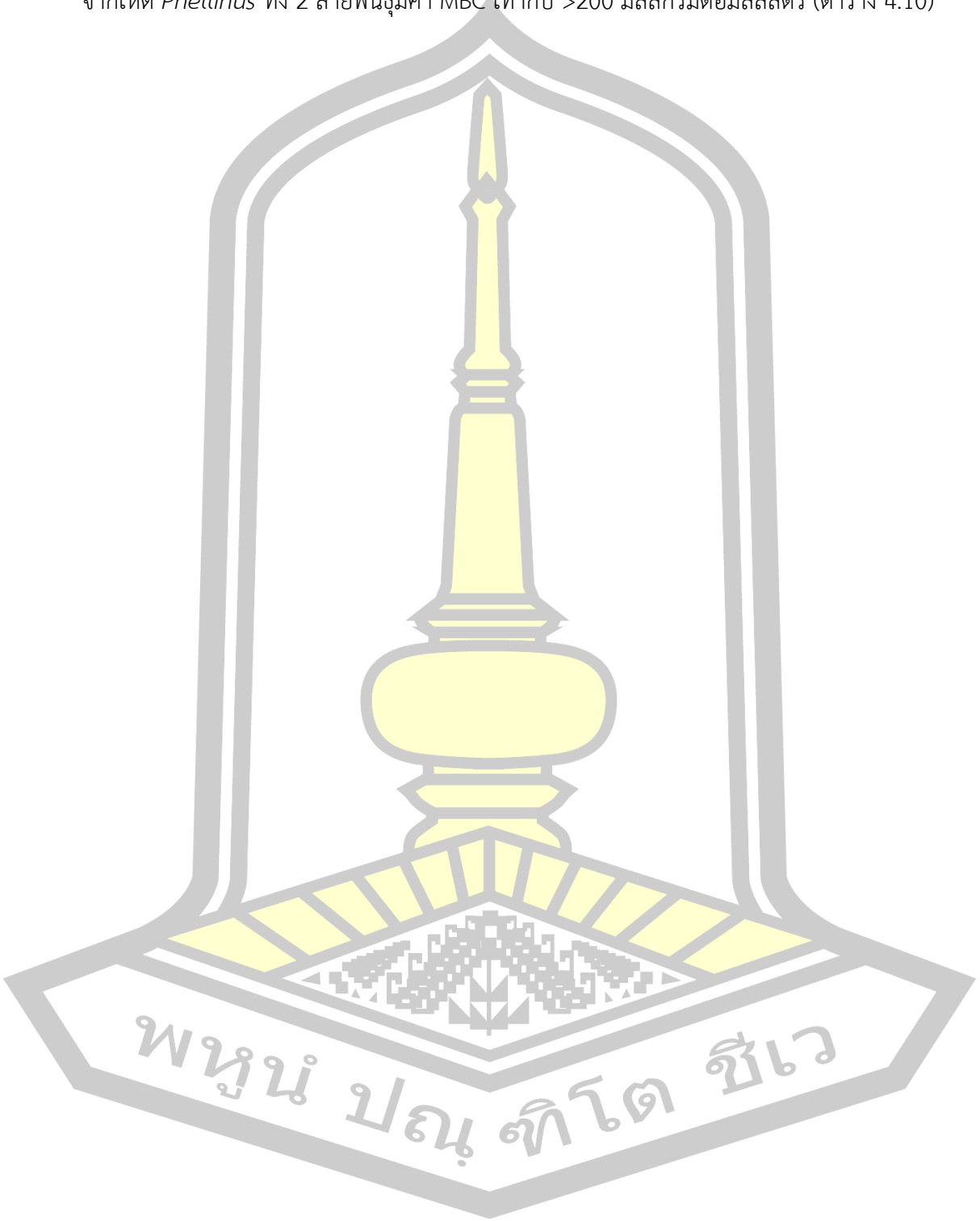
4.4.2.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ (MBC) โดยวิธี Broth microdilution

จากการทดสอบเบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Proteus mirabilis* (TISTR 100), *S. aureus* (ATCC 25933) และ *S. epidermidis* (TISTR 518) ดังนั้นจึงทำการทดสอบต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบโดยวิธี Broth microdilution พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. mirabilis* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาสารสกัดหยาบจากเส้นใย *P. igniarius* และดอกเห็ด *P. nigricans* มีค่า MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากเส้นใย *P. nigricans* มีค่า MIC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *P. mirabilis* พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่า MBC เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.10)

ผลการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *P. igniarius*, *P. nigricans* และดอกเห็ด *P. nigricans* มี MIC เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. robustus* มีค่า MIC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ด *Phellinus* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่า MBC เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.10)

ผลการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidermidis* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC ต่ำสุดเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. nigricans* มีค่า MIC เท่ากับ

100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ด *Phellinus* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่า MBC เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.10)



ตาราง 4.9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์ด้วยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* โดยวิธี Agar well diffusion

	บริเวณที่มีการยับยั้ง (Inhibition zone) ของแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)							
	E.coli	*Ps. aeroginosa*	*Proteus mirabilis*	*S. typhimurium*	*B. cereus*	*S. aureus*	*S. aureus (MRSA)*	*S. epidermidis*
เส้นใย								
P. igniareus	-	-	16.27 ± 0.21^{bc}	-	-	16.90 ± 0.79^{cd}	-	9.13 ± 0.60^{e}
P. nigricans	-	-	15.83 ± 0.68^{c}	-	-	15.50 ± 0.50^{d}	-	-
P. robustus	-	-	-	-	-	-	-	-
P. setulosus	-	-	-	-	-	-	-	-
ดอก								
P. igniareus	-	-	17.63 ± 0.50^{b}	-	-	17.73 ± 0.93^{c}	-	16.70 ± 0.88^{c}
P. nigricans	-	-	16.53 ± 0.55^{bc}	-	-	17.90 ± 0.36^{c}	-	14.33 ± 0.83^{d}
P. robustus	-	-	-	-	-	9.33 ± 0.21^{e}	-	-
P. setulosus	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	11.23 ± 0.93	17.90 ± 0.56	21.17 ± 0.67^{a}	25.83 ± 1.61	23.47 ± 1.27	27.40 ± 1.97^{b}	-	26.67 ± 1.89^{b}
Tetracycline	24.58 ± 1.02	-	-	23.47 ± 1.50	18.57 ± 0.60	31.63 ± 0.55^{a}	-	31.69 ± 1.46^{a}

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ a ,b, c, d และ e ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD) Negative control คือ DMSO ความเข้มข้น 5% (v/v) และ Positive control คือ gentamicin ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ tetracycline 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, - คือ ไม่สามารถหาค่าได้

ตาราง 4.10 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียกอโรค ในมนุษย (MBC) (มิลลิกรัมตอมิลลิลิตร)

สารสกัด	เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ															
	E.coli		*Ps. aeroginosa*		*Proteus mirabilis*		*S. typhimurium*		*B. cereus*		*S. aureus*		*S. aureus (MRSA)*		*S. epidermidis*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
เส้นใย																
P. igniarius	-	-	-	-	50	>200	-	-	-	-	50	>200	-	-	25	>200
P. nigricans	-	-	-	-	100	>200	-	-	-	-	50	>200	-	-	-	-
P. robustus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. setulosus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ดอก																
P. igniarius	-	-	-	-	25	>200	-	-	-	-	50	>200	-	-	50	>200
P. nigricans	-	-	-	-	50	>200	-	-	-	-	50	>200	-	-	50	-
P. robustus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	>200	-	-	-	-
P. setulosus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamycin	-	-	-	-	1.25	10	-	-	-	-	5	10	-	-	10	20
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	20	-	-	2.5	5

หมายเหตุ : MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Inhibitory Concentration)
MBC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration), - คือ ไม่ได้ทดสอบ

4.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

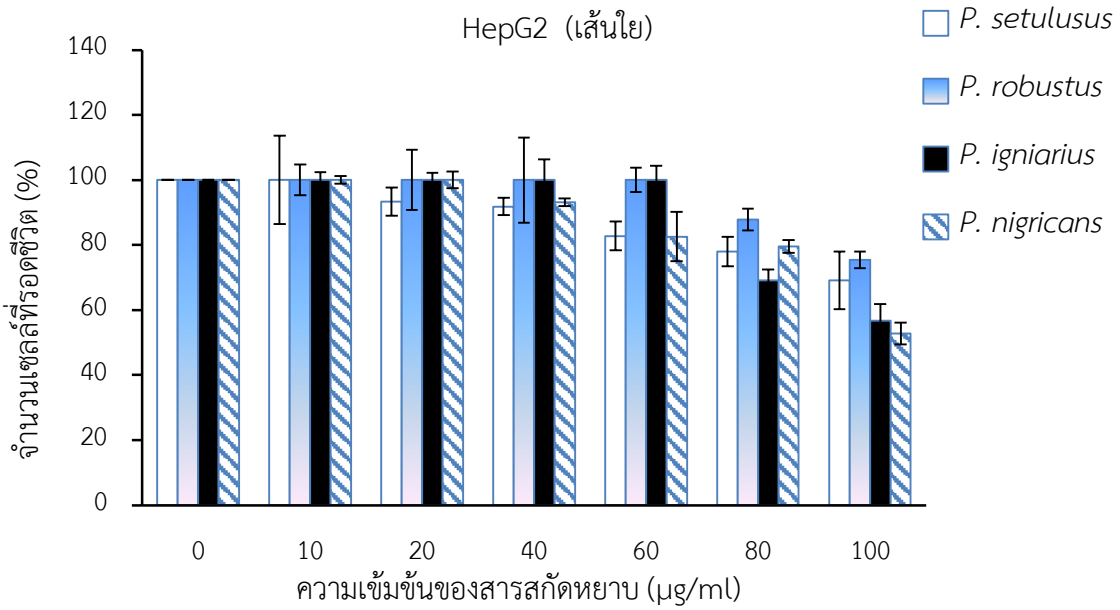
จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT assay บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus* พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *Phellinus* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ตั้งแต่ 56.72 ± 5.14 ถึง 69.13 ± 8.81 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 56.72 ± 5.14 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 112.19 ± 11.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเส้นใยเห็ด *P. nigricans* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 52.87 ± 3.35 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 303.88 ± 29.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นใยเห็ด *P. robustus* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 75.37 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 153.02 ± 21.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นใยเห็ด *P. setulosus* ให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 69.13 ± 8.81 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 503.61 ± 175.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 4.11)

นอกจากนี้พบว่าในสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *Phellinus* ให้เปอร์เซ็นต์ความรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ตั้งแต่ 2.00 ± 0.00 ถึง 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *P. igniarius* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 2.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1820 ± 0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาดอกเห็ด *P. nigricans* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับเท่ากับ 17.10 ± 3.65 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความ

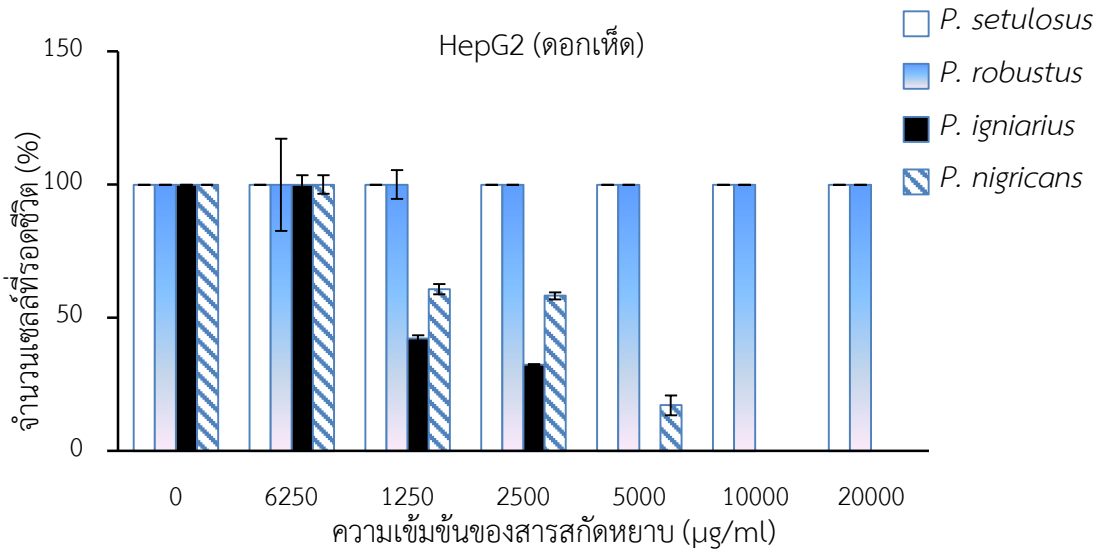
เข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 2920 ± 0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าในดอกเห็ด *P. robustus* และ *P. setulosus* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งตับ 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.11)

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *Phellinus* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ตั้งแต่ 54.53 ± 3.15 ถึง 69.31 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 54.53 ± 3.15 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 129.45 ± 32.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเส้นใยเห็ด *P. robustus* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 62.04 ± 5.30 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 201.86 ± 64.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เส้นใยเห็ด *P. setulosus* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 69.31 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 299.72 ± 41.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเส้นใยเห็ด *P. nigricans* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 71.72 ± 3.81 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 706.34 ± 12.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *Phellinus* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ตั้งแต่ 7.62 ± 1.13 ถึง 70.82 ± 6.94 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอก *P. igniarius* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 35.31 ± 4.58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1550 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาดอกเห็ด *P. nigricans* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 7.62 ± 1.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 2230 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดอกเห็ด *P. robustus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 70.82 ±

6.94 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าในดอกเห็ด *P. setulosus* โดยให้ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 4.11)

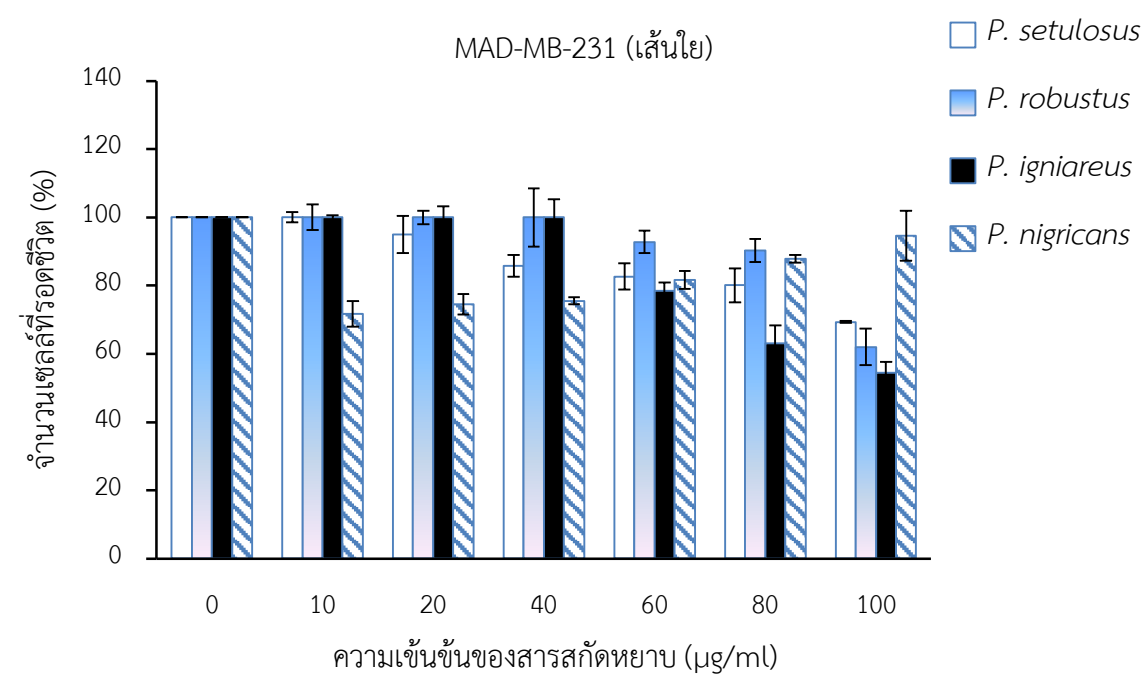


(ก)

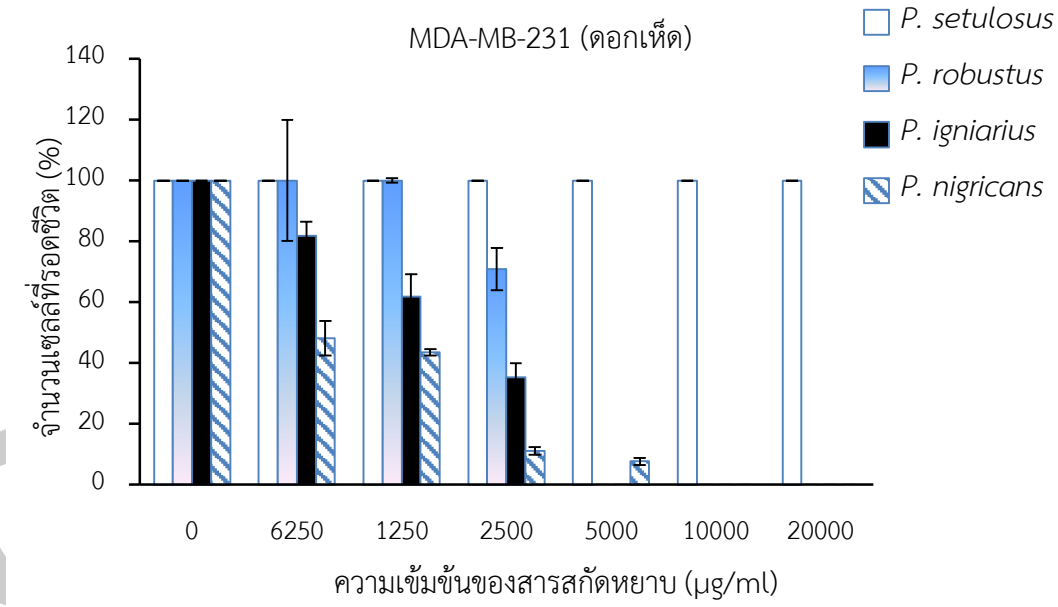


(ข)

ภาพประกอบ 4.5 แสดงผลจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (%) โดยวิธี MTT เซลล์มะเร็งตับ HepG2 จากสารสกัดหยาบเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข)



(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 4.6 แสดงผลจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (%) โดยวิธี MTT เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 จากสารสกัดหยาบเส้นใยเห็ด (ก) และดอกเห็ด (ข)

ตาราง 4.11 ผลการศึกษาค่า IC_{50} การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ด้วยวิธี MTT ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์เส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์

ตัวอย่าง	ค่า IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)*	
	HepG2	MDA-MB-231
เส้นใย		
P. igniarius	112.19 ± 11.40[a]	129.45 ± 32.83[a]
P. nigricans	303.88 ± 29.67[c]	706.34 ± 12.30[c]
P. robustus	153.02 ± 21.44[b]	201.86 ± 64.12[b]
P. setulosus	503.61 ± 175.73[c]	299.72 ± 41.10[b]
ดอก		
P. igniarius	1820 ± 0.11[e]	1550 ± 0.18[d]
P. nigricans	2920 ± 0.11[d]	2230 ± 0.20[e]
P. robustus	-	-
P. setulosus	-	-

หมายเหตุ : ± ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* a, b, c, d, และ e ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี Turkey's Honestly Significant Different (HSD)

- คือ ไม่สามารถหาค่าได้

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

5.2 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

5.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

5.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

.

5.1 ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *Phellinus* spp.

จากการศึกษาการเจริญและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของเส้นใยเห็ด *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว พบว่าเส้นใย *P. igniarius P. nigricans* และ *P. robustus* เจริญได้ดีและมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงในอาหาร GY2 สำหรับเส้นใย *P. setulosus* เจริญได้ดีในอาหาร GY1 โดยพิจารณาจากการเจริญของเส้นใยเห็ดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใย พบว่า *P. igniarius* (367.60 ± 39.84 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) *P. nigricans* (557.33 ± 20.50 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) *P. robustus* (471.94 ± 37.78 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) และ *P. setulosus* (556.40 ± 6.43 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) เนื่องจากทั้งสองสูตรอาหาร GY1 และ GY2 จะประกอบไปด้วย glucose, yeast extract, malt extract และ peptone ซึ่งเหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเห็ด สอดคล้องกับงานวิจัย Luo และคณะ (2010) ศึกษาอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยเห็ด *Phellinus baumii Pilát* เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โดยสูตรอาหารประกอบด้วย glucose, yeast extract, peptone และมีแร่ธาตุที่เติมในอาหารคือแมกนีเซียม โพแทสเซียม และวิตามินบี 1 นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ระยะเวลาในการเพาะ และสภาวะในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ในการทำวิจัยนี้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเห็ดมีค่าเท่ากับ 6.8 (Wang *et al*., 2014) โดยทั่วไปเส้นใยเห็ดหลายชนิดสามารถเจริญได้ในระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

อยู่ในช่วง 5 ถึง 7 อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าในสภาวะที่เป็นกรด 6 จะเหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและการผลิตเมแทบอไลต์ (Shin *et al*., 2007)

5.2 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

จากการศึกษาพบว่า *P. igniarius* *P. nigricans* และ *P.robustus* ให้น้ำหนักแห้งเส้นใยมากที่สุด (11.32 ± 5.12 , 10.74 ± 3.99 และ 10.20 ± 4.04 กรัมต่อลิตร) และน้อยที่สุดคือ *P. setulosus* (9.25 ± 5.76 กรัมต่อลิตร) พบว่าสารสกัดจากเส้นใย *P. igniareus* ให้ปริมาณสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด (19.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบมากที่สุด (798.81 ± 26.30 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ) จากการวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อนจากเห็ด *Phellinus* spp. หลายสายพันธุ์แตกต่างกัน ได้แก่ *P. linteus* (Kim *et al*., 2010), *P. igniarius* (Chen *et al*., 2013), *P. baumii* (Ge *et al*., 2013) และ *P. ribis* (Liu & Wang., 2007) สอดคล้องกับงานวิจัยมีรายงานการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. linteus* (PL-N1) พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลประกอบไปด้วย อะราบิโนส ไซโรส กลูโคส และกาแลคโตส (Pei *et al*., 2015)

5.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* spp.

จากการศึกษาผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมพบปริมาณสูงสุดในสารสกัดหยาบเส้นใย *P. igniarius* (97.76 ± 2.20 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกับหยาบ) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดในสารสกัดหยาบดอก *P. igniarius* (300.80 ± 1.17 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดหยาบ) สอดคล้องกับงานวิจัย (Ozencan *et al*., 2014) พบว่าสิ่งมีชีวิตเช่น พืช และเห็ดรา มักจะพบสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดจากเห็ดมีสรรพคุณทางยามีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Shu & Lung, 2008)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนรวมจากดอกเห็ด *P. igniarius* ให้ปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุด (38.77 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) และเส้นใยเห็ด *P. igniarius* ให้ปริมาณโปรตีนรวมมากที่สุด (14.71 ± 1.55 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งมีการศึกษาการสกัดสารจากดอกเห็ด *P. linteus* โดยใช้น้ำสกัดและตกตะกอน

ด้วยเอทานอล จากนั้นทำการไดอะไลซีส (dialysis) ได้สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (polysaccharide protein complex) ซึ่งคิดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์รวมและโปรตีนรวมเท่ากับ 73 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบมอโนแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบอีก 5 ชนิด (Kim *et al*., 2006) ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lui และคณะ 2016 โดยทำการศึกษาสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด Sclerortia of *Polyporus rhinocerus* พบว่าเป็น heteropolysaccharide-protein complex โดยประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 45.70 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 44.2 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* โดยเปรียบเทียบจากตำแหน่งของพีคใน spectrum โดยพีคที่ปรากฏส่วนใหญ่เป็นพีคที่เลขคลื่นช่วงประมาณ 3200 -3600 cm^{-1} (O-H stretching), 2800-3200 cm^{-1} (C-H stretch), 1600-1350 cm^{-1} (C= O stretch) และ 1200-1000 cm^{-1} (C-O-C stretch) โดยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในพอลิแซ็กคาไรด์ (Salehi *et al*., 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยการศึกษาคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ในเห็ดทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Antrodia cinnamomea* (AC-P), *Coriolus versicolor* (CV-P), *Grifola frondosa* (GF-P), *Ganoderma lucidum* (GL-P) และ *Phellinus linteus* (PL-P) พบว่าโดยวิเคราะห์ด้วย FT-IR พบว่าโครงสร้างประกอบด้วย OH, CH, C-O-C และ C-O-H group มีพีคที่เลขคลื่นช่วงประมาณ 3400, 2930, 1175 และ 1000 cm^{-1} ตามลำดับ (Su *et al*., 2016) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยทำการศึกษาฤทธิ์สารต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของเห็ดกินได้ 8 ชนิด โดยวิเคราะห์ด้วย FT-IR พบว่าโครงสร้างเป็น **α** หรือ **β**-conformation ประกอบด้วย OH และ CH group และพบหมู่ amide ช่วงประมาณ 1636 -1411 cm^{-1} แสดงพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (Ren *et al*., 2014) จากการรายงานของ Kozarski และคณะ 2011 มีการรายงานพบโปรตีนแสดงในพีคช่วง 1635, 1540 และ 1412 cm^{-1} (Ren *et al*., 2014)

5.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

5.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์รวมพบว่าเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 62.45 ± 0.96 และ 64.27 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ อีกทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด (ค่า IC_{50} เท่ากับ 27.24 ± 0.76 และ 28.06 ± 0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลการตรวจสอบฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP ดีสุดคือ สารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* (119 ± 1.63 ไมโคร

โมลเฟอรัสซัลเฟตต่อสารสกัดหยาบ) ดังนั้นจึงต้องใช้การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระหลายวิธีเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวซึ่ง การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจน อะตอมของสารต้านอนุมูลอิสระแก่อนุมูลของ $DPPH^{\bullet}$ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS เป็นการทดสอบความสามารถของต้าน อนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล $ABTS^{\bullet}$ ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วย $K_2H_2O_8$ และการทดสอบประสิทธิภาพใน การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ สังเคราะห์เพื่อเป็นตัวแทนของอนุมูลที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ (Moongngarm *et al*., 2012)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบทั้ง 3 วิธี มีผลการทดลองที่แตกต่างกัน ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เน้นการให้ไฮโดรเจนอะตอมของอนุมูลอิสระและต้องการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระสารสกัดจากเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius* ออกฤทธิ์ดีที่สุด และถ้าต้องการรีดิวซ์อนุมูลอิสระเลือกสารสกัดจากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์สูงสูด จากการทดสอบประสิทธิภาพในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี พบว่า เส้นใยเห็ด *P. igniarius* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีและหลากหลาย ทั้งการให้ไฮโดรเจนอะตอมของอนุมูลอิสระ การให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระและการรีดิวซ์ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดพิมานโดยวิธี FRAP พบว่าสารสกัด *P. rimosus* ที่สกัดด้วยเอทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (Gen *et al*., 2013) สารสกัดจากดอกเห็ด *P. igniarius* พบว่าสูงกว่าสารสกัดจากเส้นใยและ culture filtrates (Jin *et al*., 2014) แต่เมื่อทำการศึกษาในการทดลองนี้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดออกฤทธิ์ดีกว่าดอกเห็ด *Phellinus* ทั้ง 4 สายพันธุ์

5.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ด *Phellinus* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. igniarius, P. nigricans*, *P. robustus* และ *P. setulosus*ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* (ATCC25922), *Ps. aeroginosa* (DMST4739), *Proteus mirabilis* (TISTR100), *S. typhimurium* (TISTR1471), *B. cereus* (ATCC11778), *S. aureus* (TISTR2933), *S. aureus* (MRSA) (DMST20625), *S. epidermidis* (TISTR518) และยีสต์ *C. albicans* (TISTR5779) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยและดอกเห็ดสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *Proteus*

mirabilis, *S. aureus* และ *S. epidermidis* เมื่อหาคาความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบวาสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. mirabilis* (TISTR100) ได้ดีที่สุด (MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* และ *P. nigricans* มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. aureus* (TISTR2933) ได้ดีที่สุด (MIC ต่ำสุดเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. igniarius* มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อ *S. epidermidis* (TISTR518) ได้ดีที่สุด (MIC ต่ำสุดเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีค่า MBC เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งมากที่สุดคือแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่กล่าวว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีโอกาสยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีชั้นไขมันและชั้นของ ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สารสกัดเข้าถึงเซลล์แบคทีเรียได้ยาก (Yang *et al*., 2017) นอกจากนี้พบการรายงานของ Duvnjak และคณะ (2016) ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจากสารสกัดเห็ด *Coriolus versicolor* พบว่าสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อทั้ง 3 ชนิด ชนิด คือ *P. mirabilis*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* และพบการรายงานทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อสารสกัดดอกเห็ดป่ากินได้จากป่าประเทศโปแลนด์โดยสกัดจากเอทานอลผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเชื้อทั้ง 3 ชนิดเช่นกัน (Nawacka *et al*., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองแต่จะต่างกันที่ใช้สารสกัดในการทดลองนี้สกัดด้วยน้ำ

5.4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต

จากการศึกษาพบว่าผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG 2 ค่า IC_{50} เส้นใย *P. igniareus* ฤทธิ์ดีที่สุด (112.19 ± 11.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และดอกเห็ด *P. igniareus* (1820 ± 0.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 พบค่า IC_{50} เส้นใย *P. igniareus* ฤทธิ์ดีที่สุด (129.45 ± 32.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และดอกเห็ด *P. igniareus* (1550 ± 0.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับงานวิจัย (Pei *et al*., 2015) ศึกษาลักษณะโครงสร้างและฤทธิ์ต้านเนื้องอกของพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. linteus* โดยใช้ alkaline เป็นตัวสกัด พบพอลิแซ็กคาไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (a novel high molecular weight polysaccharide, PL-N1) นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี DEAE-Sephadex A-25 และวิเคราะห์สารต้านเนื้องอกในหลอดทดลองโดยวิธี MTT แสดงค่า PL-N1 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 ได้ระดับหนึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณด้วย ดังนั้น PL-N1 อาจได้รับการพัฒนาเป็นสารจากธรรมชาติมีฤทธิ์ต้านทานเนื้องอก จากการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และฤทธิ์ต้านเนื้องอกของสารสกัด

พอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด *P. igniarius* โดยการสกัด intracellular polysaccharide (IPS) ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ด *P. igniarius* แล้วนำมาตกตะกอนและบริสุทธิ์ด้วย ethanol, ion-exchange และ size exclusion chromatography สามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ได้แก่ IPSW-1, IPSW-2, IPSW-3 และ IPSW-4 ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเนื้องอกของพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้โดยวิธี MTT สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ SW480 และ HepG2 ได้ในระดับหนึ่งซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ดังนั้นอาจนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการพัฒนาสารต้านมะเร็ง (Li *et al.*, 2015)

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

แฟรงค์ ชาญบุญญสิทธิ์ (2550) *สมุนไพรว่าด้วยเห็ดหลินจือพันปี.* กรุงเทพฯ, อมรินทร์พริ้นติ้งแอนพลับลิชชิ่ง.

นิภาพร อามัสสา และนิวัฒ เสนาะเมือง (2550) *ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหิ้งบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ*. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น, 10(4), 311-321.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ (2547) *แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค*. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ, noble print.

พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์, ณัฏฐีวรรณ ปุ่นวัน และชื่นฤดี ไชยวสุ (2538) *เอกสารประกอบการสอนชุดวิทยาการทางคลินิกเกี่ยวกับจุลชีว ปรสิต และภูมิคุ้มกัน*. พิมพ์ครั้งที่ 2. สุโขทัย, มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

พร้อมสิน มาศรีนวน (2558) การวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์. Basic mammalian cell culture 2015. สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล, 19-29.

ภัทรชัย กีรติสิน (2549) *ต ราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์*. กรุงเทพฯ, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตรศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม (2539) *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เครื่องมือ.* ชวนพิมพ์. 139-197.

ราชบัณฑิตยสถาน (2539) *เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.* กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์อมรินทร์.

วิลาส พุ่มพิมล (2556) *เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ, ดวงกมลพับลิชชิ่ง.

ศุภชัย สมัปปิโต (2541) *จุลชีวอุตสาหกรรม.* คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สุนันทา รัตนาโก และคณะ (2554) *ชีวเคมี*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, เชนเกจ เลินชิ่ง (ประเทศไทย).

สมจิตร อยู่เป็นสุข (2552) *ราวิทยา*. เชียงใหม่, พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์.

โสภณ คงสำราญ (2524) *แบคทีเรียทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

อนัญพร พรหมเมตตา (2554) *วงชีวิตและการเจริญของเห็ด Phellinus linteus และ Phellinus igniarius (Hymenochaetaceae) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเห็ดหิ้งชนิดอื่น*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ (2556) *จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ, จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และวัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ (2556) *แบคทีเรียทางการแพทย์*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุทัยวรรณ แสงวณิช (2542) *มารู้จักเห็ดกันเถอะ.* เรื่องน่ารู้สำหรับประชาชน เล่มที่ 22 ชมรมนักเรียนทุนอนันทมหิดล, กรุงเทพฯ, หน้า 22-36.

โอภา วัชระคุปต์ และคณะ (2549) *สารต้านอนุมูลอิสระ.* กรุงเทพฯ, พี.เอส.พริ้นท์.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Alverez, AI., Real, R., Perez, M., Mendoza, G., Prieto, J.G., & Merino, G. (2010). Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(2), 598-617.

Ameri, A., Vaidya, J.G., & Deokule, S.S. (2011). In vitro evaluation of anti-staphylococcal activity of *Ganoderma resinaceum* from Pune, India. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 328-333.

Aouadhi C, Maaroufi A and Mejri S (2014). Incidence and characterisation of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *Journal of International Dairy Technology*, 67, 95-102.

Arora, D. (1986). Mushroom Demystified. Ten Speed Press, Berkeley.

Ayer, W.A., Muir, D.J., & Chakravarty, P. (1996). Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. *Phytochemistry*, 42, 1321-1324.

Benzie, F.F. & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 299, 15-23.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M.S.S., & Ho, W.K.K. (2005). Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 59(3), 549–555.

Chang, S.T. (2008), Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. *Mushrooms as functional foods*, 1-33.

Chen, L., Pan, J., Li, X., Zhou, Y., Meng, Q., & Wang Q. (2011). Endo-polysaccharide of *Phellinus igniarius* exhibited anti-tumor effect through enhancement of cell mediated immunity. *International Immunopharmacology*, 11, 255-259.

Deng, P., Zhang, G., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Fan, K., et al. (2010). Extraction and in vitro antioxidant activity of intracellular polysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-02. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(1), 50-54.

Ding, X., Hou, Y.L., & Hou, W.R. (2012). Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Boletus speciosus* Forest. International *Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 613-618.

Ding, X., Tang, J., Cao, M., Guo, C.X., Zhong, J., et al. (2010). Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*. *Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 271-275.

DuBois, M., Gilles KA, Hamilton JK, Rebers, PA. & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D., Sknepnek, A. & Nikšić, M. (2016) . Advances in batch culture fermentedCoriolus versicolormedicinalmushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 1–8.

Ferreira, MA., Barbosa, C., Falco, V., Leão, C. & Mendes-Faia, A. (2009). The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of Saccharomyces cerevisiae in synthetic media with different nitrogen concentrations. J Ind Microbiol Biotechnol, 36(4), 83-571.

Fischer, D.W. (2006). *Amanita phalloides*, The World's Most Dangerous Mushroom. [Online]. Available: www.amamitashop.com/ .../deathcap.htm (November 15, 2006).

Gao, C., Zhong, L., Jiang, L., Geng, C., Yao, X. & Cao, J. (2013). *Phellinus linteus* mushroom protects against tacrine-induced mitochondrial impairment and oxidative stress in HepG2 cells. *Phytomedicine*, 20, 705-709.

Griffin, D.H. (1994). Fungal Physiology (2nd ed). Wiley-Liss. New York.

Guglielmo, F., Gonthier, P., Garbelotto, M. & Nicolotti, G., (2008). A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within *Ganoderma*, *Inonotus* s.l. and *Phellinus* s.l. *FEMS Microbiology Letters*, 228-237.

Hobbs, C. (1998). Handmade Herbal Medicines: Recipes for Potions, Elixirs & Salves. Loveland, CO: Interweave Press.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. & Williams S.T., (1994) *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. pp. 787.

Hsieh, PW, Wu, J., Bin., & Wu, YC. (2013). Chemistry and biology of *Phellinus linteus. BioMedicine (Netherlands)*, 3(3), 106–113.

Huang, C.R., Lien, C.Y., Tsai, W.C., Lai, W.A., Hsu, C.W., Tsai, N.W., Chang, C.C., Lu, C.H., Chien, C.C., & Chang, W.N. (2017). The clinical characteristics of adult bacterial meningitis caused by non-Pseudomonas (*Ps.*) *aeruginosa Pseudomonas* species: A clinical comparison with *Ps. aeruginosa* meningitis. *Journal of Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 1-7.

Jiang, P., Yuan, L., Cai, D., Jiao, L., & Zhang, L. (2015). Characterization and antioxidant Activities of the polysaccharides from mycelium of *Phellinus pini* and culture medium. *Carbohydrate Polymers,* 117, 600-604.

Jin, G.H., Lee, M.W., Im, K.H., & Lee, T.S. (2014). Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and xanthine oxidase inhibitory activities of three extracts from *Phellinus igniarius*. *J* mushroom, 12, 1-7.

Jin, Q-l., Zhang, Z-f., Lv, G-y., Cai, W-m., Cheng, J-w., Wang, J-g., & Fan, L-f. (2016). Antioxidant and DNA damage protecting potentials of polysaccharide extracted from *Phellinus baumii* using a delignification method. *Carbohydrate Polymers*, 152, 575-582.

Joeng, J.W., Lim, Y.W., Lee, S.J. & Jung, H.S. (2005). Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from combined data of ITS and mitochondrial SSU rDNA sequences. *Journal* of *Microbiology* and *Biotechnology*, 15, 1028-1038.

Mason, P. (2011). Dietary Supplements. Fourth ed. London: Pharmaceutical Press.

Jouraiphy, A., Amir, S., Winterton, P., El Gharous, M., Revel, J.C., & Hafidi, M. (2008). Structural study of the fulvic fraction during composting of activated sludge–plant matter: Elemental analysis, FTIR and 13C NMR. *Bioresource Technology*, 99, 1066–1072.

Jung, I.C., Kim, S.H., Kwon, Y.I., Kim, S.Y., Lee, J.S., & Park, S. (1997). Cultural condition for the mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains. *Korean Journal of Mycology*, 25, 133-142.

Kamtekar**,** S., Keer, V., & Patil, V. (2014). Estimation of Phenolic content, Flavonoid content, Antioxidant and Alpha amylase Inhibitory Activity of Marketed Polyherbal Formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* , 4 (09), 061-065.

Kibby, G. (1979). Mushroom and Toadstolls a Field Guide Oxford university Press. 256.

Kim, D.H., Shim, S.B., Kim, N.J., & Jang, I.S. (1999). **α**-Glucuron-idase inhibitiory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biological and Pharmaceutical Bullentin*, 22, 162-164.

Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H., & Yun, J.W. (2002). Mycelial growth and exo-polysaccharide production submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letter in Applied Microbiology*, 34, 56-61.

Kim, G.Y., Lee, J.Y., Lee, J.O., Ryu, C.H., Choi, B.T., & Jeong, Y.K. (2006). Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70, 1218-1226.

Kim, D., Kim, K., Kang, J., & Kim, H. (2013). Effect of Phellinus baumii-Biotransformed Soybean Powder on Lipid Metabolism in Rats. *Nutr. Food Sci*, 18(2), 98-103.

Klinhom, U., Tepayasuksri, C., Prapawicha, S, Chanaboon, T., Khomkratok, S., Wongpakom, K., & Suakaew, S. (2001). Traditional Medicine in Northeast of Thailand. *Submitted to Mahasarakham University*. 345.

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J., & Griensven, L.V. (2011). Antoxidation and immunomodulating activity of polysaccharide extract of medical mushrooms *Agaricus bisporus, Agaricus brasiliensis, Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food Chemistry, 129, 1667-1675.

Kozarski, M.S., Klaus, A.S., Niksic, M.P., Van Griensven, L.J.L.D., Vrvic, M.M., & Jakovljevic, D. M. (2013). Polysaccharides of higher fungi: Biological role, structure, and antioxidative activity. *Hemijska industrija*, 68, 305-320.

Kriengsak, T., Unaroj, B., Kevin, C., Luis, C., & David, H.B. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Compo*sition *and Analysis*. 19, 669 - 675.

Lee, B.C., Bae, J.T., Pyo, H.B., Choe, T.B., Kim, S.W., Hwang, H.J. et al. (2003). Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 574-581.

Leda C.M. Cunha, Maria Lúcia G. Monteiro, José M. Lorenzo, Paulo E.S. Munekata, Voster Muchenje, Francisco Allan L. de Carvalho & Carlos A. Conte-Junior (2018). Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. *Food Research International*. 111, 379–390.

Li, S.C., Yang, X.M., Ma, H.L., Yan, J.K., & Guo, D.Z. (2015). Purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides extracted from *Phellinus igniarius* mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 133, 24-30.

Lincoff, G.H., & Mitchel, D.H. (1977). Toxic and Hallucinogenic Myushroom Poisoning. *Handbook for Physicians and Mushroom Hunter.* Van Nostrand & Reinhlod Co., New York.79, 700-704.

Liu, Y., Wang, F. (2007). Structural characterization of an active polysaccharide from *Phellinus ribis*. *Carbohydrate Polymers*, 70, 386-392.

Liu, C., Chen J, Chen, L, Huang, X., & Cheung, P. (2016). Immunomodulatory Activity of Polysaccharide– Protein Complex from the Mushroom Sclerotia of Polyporus rhinocerus in Murine Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 3206–3214.

Mackerras, D. (1995). Antioxidant and health. Fruits and vegetables or supplements. *Food Australia*, 47, 3-23.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., & Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339, 69-72.

Melaughlin, D.J., Berres, M.E., & Szabo, L.J. (1985). Molecules and morphology in basidiomycete phylogeny. *Candian Journal of Botanyl*, 73(1), 648-692.

Meng, F., Liu, X., Jia, L., Song, Z., Deng, P., & Fan, K. (2010). Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 79, 700-704.

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., & VanBeek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalycylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.

Money, N.P. (1998). More g's than the Space Shuttle: ballistospore discharge. *Mycologia*, 90, 547.

Moongngarma, A., Daomukda, N., & Khumpika, S. (2012). Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *APCBEE Procedia*. 2, 73 – 79.

Nakamura, H., Kawagishi, H., Watanabe, H., Sekiguchi, T., Murata, T., Usui, T., Sugiyama, K., Suganuma, H., Inakuma, T., Ito, K., Hashimoto, Y., Kameyama, M.O., & Nagata, T. (2000). A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. Elsevier Science, 1474(3), 299-308.

Nowacka, N., Nowak. R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., & Malm, A. (2014). Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 689-694.

Onanong, K., Siriton, S., Natthida, W., & Naret, M. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of functional food*, 3, 88-99.

Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersa, L., & Delikanli, B. (2014). Phenolic in human health. International Journal of Chemical Engineering and Application, 5(5), 393-396.

Pei, J.J., Wang, Z.B., Ma, H.L., & Yan, J.K. (2015). Structural features and antitumor activity of a novel polysaccharide from alkaline extract of *Phellinus linteus* mycelia. Carbohydrate Polymers, 115, 472-477.

Pongracz, J., Juhasz, E., Ivan, M., & Kristof, K. (2015). Significance of yeasts in bloodstream infection: epidemiology and predisposing factors of Candidaemiain adult patients at a university hospital (2010-2014). *Journal of Acta Microbiology etImmunologica Hungarica*, 62(3), 317-329.

Pringle, R.M. (2005). The nile perch in lake Victoria: local responses and adaptations. *Journal of the International African Institutes,* 75, 510-538.

Prywer, J., & Torzewska, A. (2012). Effect of curcumin against Proteus mirabilis during crystallization of struvite from artificial urine. *Evid Based Complement Alternat Med*. 8, 1-7.

Quelet, L. (1886). *Enchiridion fungroum* in Europamedia at Praesertim in Gallia vigentum. Lutetiae, 352.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C. (2002). Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Science, Oxford.

Reis, F.S., Barreira, J.C.M., Calhelha, R.C., Griensven, L.J., Ciric, A., Glamoclija, J., & Sokovic, M. (2014). Chemical characterization of the medicinal mushroom *Phellinus linteus* (Berkeley & Curtis) Teng and contribution of different

fractions to its bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 478-485.

Ren, L., Hermar, Y., Perera, C.O., Lewis, G., Krissansen, G.W., & Buchanan, P.K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive carbohydrates and dietary fiber*, 3, 41-51.

Rew, Y.H., Jo, W.S., Jeong, K.C., Yoon, J.T., & Choi, B.S. (2000). Cultural characteristics and fruit body formation of *Phellinus gilvus*. *Korean Journal of Mycology*, 28, 6-10.

Riss, T.L., Morvaec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., Storts, D., & Reid, Y. (2013). Cell Viability Assays. In: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Roberta, R., Nicoletta, P., Anna P., Ananth, P., Min, Y., & Catherine, R.E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Ronald, L.P., Xianli, W., Karen, S., et al. (2005). Standardized Methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4290-4302.

Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., & Merchant U.C. (2006) Xanthan Gum-A Boon to Food Industry. *Food Promotion Chronicle*, 1(5), 27-30.

Salehi, B., Bayat, M., Dezfulian, M., Sabokbar, A., & Tabaraie, B. (2016). The assessment of anti-tumoral activity of polysaccharide extracted from terrestrial filamentous fungus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 1236–1241.

Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C.F., Fukuoka, F., & Nakanishi, F. (1968). Antitumor studies on some extracts of Basidiomycetes. *Gann*, 59, 159-161.

Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y., & Inada, Y. (1985). Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 33, 3012–3015.

Shin, J.Y., Lee, S., Bae, I.Y., Yoo, S.H., & Lee, H.G. (2007). Structural and biological study of carboxymethylated *Phellinus lintues* polysaccharides. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 55, 3368-3372.

Shon, Y.H., & Nam, K.S. (2001). Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacol*, 77, 103-109.

Siswoyo, T.A., Mardiana, E., Lee, K.O. & Hoshokawa, K. (2011). Isolation and characterization of antioxidant protein fractions from Melinjo (Gnetum gnemon) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 5648-5656.

Singleton V. L., & Rossi, J. A., (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Sonawane, H., Gauri, B., Shekhar, B., & Ghole, V.S. (2014). Antimicrobial activity of *Phellinus* and *Ganoderma* samples against human pathogenic organisms. *Journal of Pharmarcy Research*, 8(7), 1008-1013.

Smiderle, F.R., Carbonero, E.R., Mellinger, C.G., Sassaki, G.L., Gorin, P.A., & Lacomini, M. (2006). Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes. Phytochemistry*, 67, 2189-2196.

Stachowiak, B., & Regula, J. (2012). Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: A review. *European Food Research and Technology*, 234, 369-380.

Shu, C.H. & Lung, M.Y. (2008). Effect of Culture pH on the Antioxidant Properties of *Antrodia camphorate* in Submerged Culture. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 39, 1-8.

Su, C-H., Lai, M-N., Lin, C-C., & Ng, LT. (2016). Comparative characterization of physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides from selected medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(10), 4385-93.

Szakiel, A., Paczkowski, C., Pensec, F. & Bertsch, C. (2012). Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochemistry*, 11, 263–284.

Tamura, K., Dudley J, Nei M. & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599.

Thetsrimuang, C., Klammuang, S., Chiablaem, K., Srisomsap, C. & Sarnthima, R. (2011). Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharide from *Lentinus polychrous* Lév. Journal of Food Chemistry, 128, 634-639.

Vilgalys, R. & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246.

Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free radical Biology and Medicine*, 36(7), 829–837.

Wagner, T. & Fischer, M. (2002). Proceeding towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l. and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia*, 94(6), 998-1016.

Wang, C.C., Chang, S.C., Stephen Inbaraj, B. & Chen, B.H. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. Food Chemistry 120, 184–192.

Wang, H., Liu, Y.M., Qi, Z.M., Wang, S.Y., Liu, S.X., Li, X., Wang, H.J. & Xia, X.C. (2013). An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties. *Current Medicinal Chemistry,* 20, 2899-2913.

Wang, Z.B., Pei, J.J., Ma, H.L., Cai, P.F. & Yan, J.K. (2014). Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 109, 49–55.

Wang, Z., Zhou, F. & Quan, Y. (2014). Antioxidant and immunological activity in vitro of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia. *Journal of Biological Macromolecules*, 64, 139-143.

Wu, C.S., Lin, Z.M., Wang, L.N., Guo, D.X., Wang, S.Q., Liu, Y.Q., Yuan, H.Q. & Lou, H.X. (2011). Phenolic compounds with NF-kB inhibit effects from the fungus

Phellinus baumii. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 21, 3261-3267.

Wu, S.J., Liaw, C.C., Pan, S.Z., Yang, H.C. & Ng, L.T. (2013). *Phellinus linteus* polysaccharides and their immunomodulatory properties in human monocytic cells. *Journal of Functional Foods*, 5, 679–688.

Xie, J.H., Xie, M.Y., Nie, S.P., Shen, M.Y, Wang, Y.X. & Li, C. (2010). Isolation, chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Food Chemistry*, 119, 1626–1632.

Xu, L., Cao, J.J., & Chen, W. (2015). Structural characterization of a broccoli polysaccharide and evaluation of anti-cancer cell proliferation effects. *carbohydrate Polymers*, 126, 179–184.

Yamac, M., & Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, 44, 660–667.

Yan, J-K., Wang, Y-Y., Ma, H-L., Wang, Z-B., & Pei, J-J. (2016). Structural characteristics and antioxidant activity *in vivo* of a polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* mycelia. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 65, 110-117.

Yang, N-C., Wu, C-C., Liu, R.H., Chai, Y-C., & Tseng, C.Y. (2016). Comparing the functional components, SOD-like activities, antimutagenicity, and nutrient compositions of *Phellinus igniarius* and *Phellinus linteus* mushrooms. *Journal of food and drug analysis*, 24, 343-349.

Yang Y., Hu Z., Shang W., Hu Q., Zhu J., Yang J., Peng H., Zhang X., Liu H., Cong Y., Li S., Hu X.,Zhou R and Rao X, 2017. Molecular and phenotypic Characterization revealed high prevalence of multidrug-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Chongqing, Southwestern China. *Journal of Microbial DrugResistance*, 23, 241-246.

Ye, S.F., Hou, Z.Q., & Zhang, Q.Q. (2007). Protective effects of *Phellinus linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytotherapy Research*, 21(10), 948-953.

Ying, S.Y., Becker, A., Swanson, G., Tan, P., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Shimasaki, S., &

Guillemin, R. (1987). Follistatin specifically inhibits pituitary follicle stimulating hormone release in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 149, 133-139.

Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology.* 18, 4-19.

Zhang, Z.F., Lv, G.Y., Song, T.T., Jin, Q.L., Huang, J.B., Fan, L.F. & Cai, W.M. (2015). Comparison of the preliminary characterizations and antioxidation properties of polysaccharides obtained from *Phellinus baumii* growth on different culture substrates. *Carbohydrate Polymers*, 132, 397-399.

Zhao, J., Gui, L.N., Sun, J.M., Cao, Y. & Zhang, H. (2010). Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Tricholoma Matsutake* sing. with ultrafiltration. *Journal Life Science*, 4, 17-20.

Zhu, T., Kim, S.H. & Chen, C.Y. (2008). A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. Current *Medicinal Chemistry*, 15(13), 1330-1335.

Zou, X., Guo, X. & Sun, M. (2009). pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus linteus* and its antihyperlipemia activity. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(2), 277-281.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และการเตรียมสารเคมี

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร (ต่อลิตร)

1. อาหาร Potato Malt Peptone (PMP)

Malt extract	10 กรัม
Peptone	1 กรัม
PDB	24 กรัม

2. Glucose Yeast Extract 1 (GY1)

Glucose	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Malt extract	20 กรัม
Peptone	1 กรัม

3. Glucose Yeast Extract 2 (GY2)

Glucose	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
Malt extract	20 กรัม
Peptone	1 กรัม
KH_2PO_4	0.46 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 กรัม
Thiamine (B_1)	2 มิลลิกรัม

ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 นำไปต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ลงไปในขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ขวดอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำไปเทลงในจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยทิ้งไว้จนอาหารแข็งจึงนำไปใช้

Mueller Hinton Agar (MHA)

Beef infustion	300 กรัม
Casamino acids	17.5 กรัม
Starch	1.5 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 นำไปต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ลงไปในขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ขวดอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำไปเทลงในจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยทิ้งไว้จนอาหารแข็งจึงนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และเชื้อรา

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1000 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 นำไปต้มให้วุ้นละลายแล้วใส่ลงไปในขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้ขวดอาหารมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำไปเทลงในจานเพาะเชื้อแล้วปล่อยทิ้งไว้จนอาหารแข็งจึงนำไปใช้

การเตรียมสารเคมี

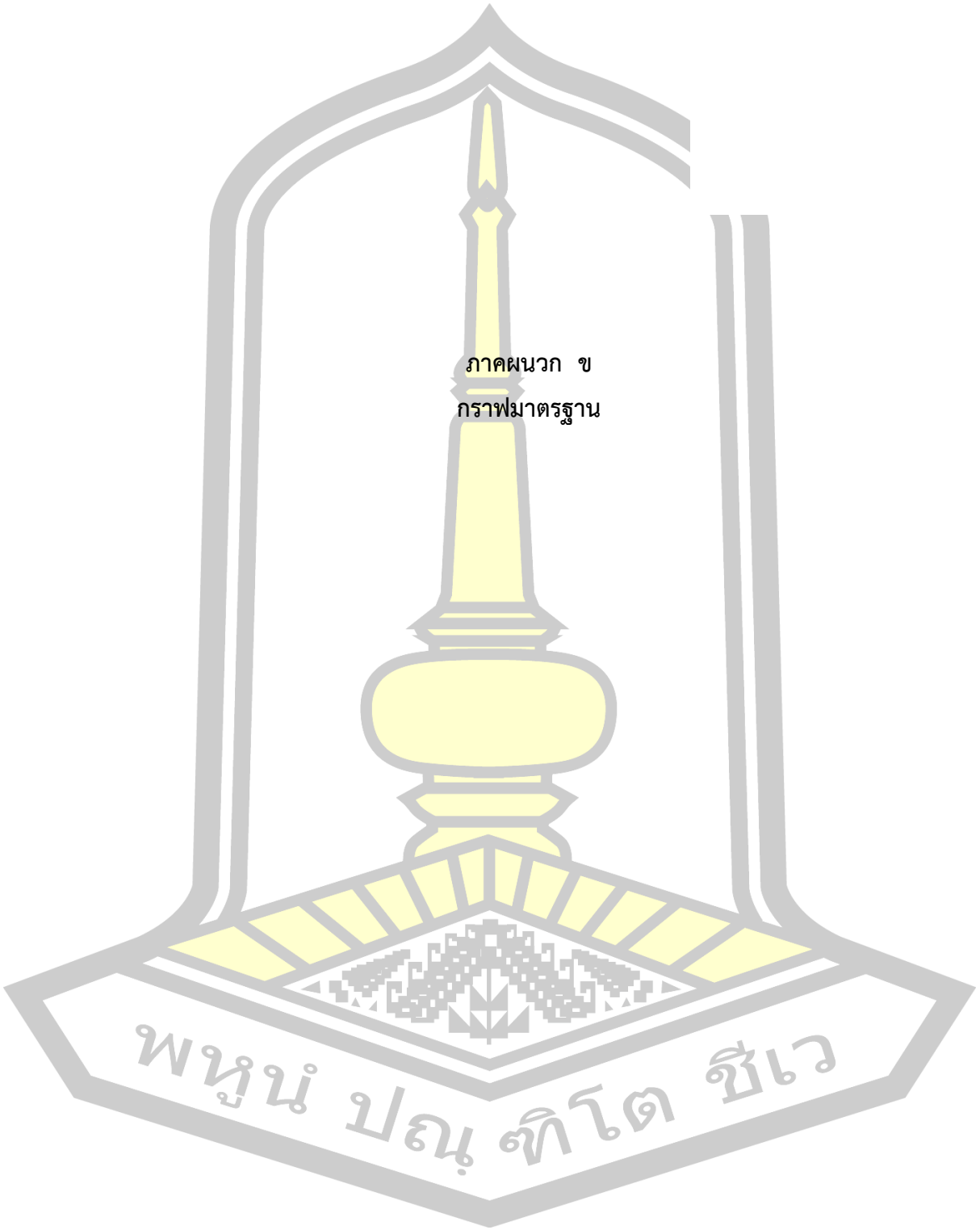
Normol saline solution

Nacl	0.85 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 15 นาที

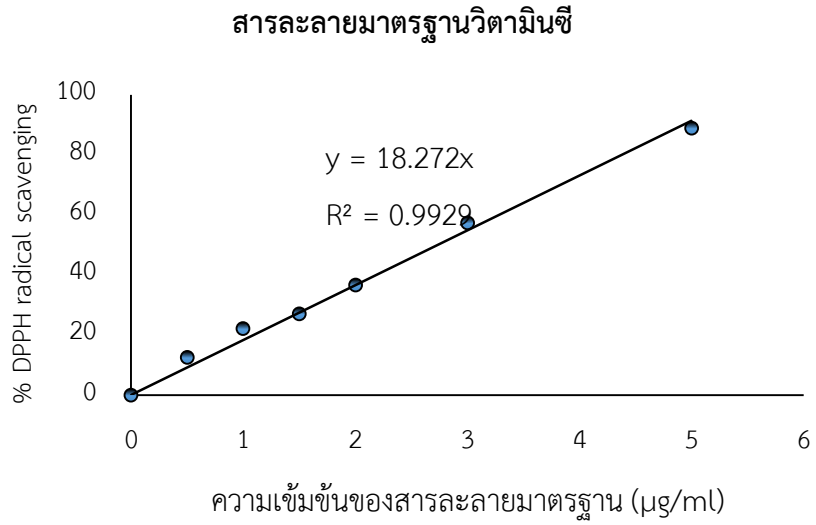
McFarland standard No. 0.5

1% Sulfuric acid	9.95 มิลลิลิตร
1.175% Barium chloride	0.05 มิลลิลิตร

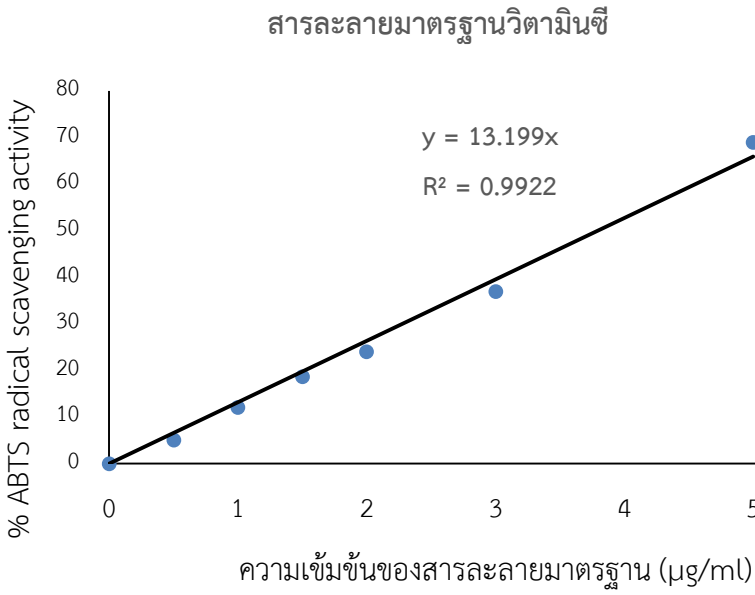


ภาคผนวก ข

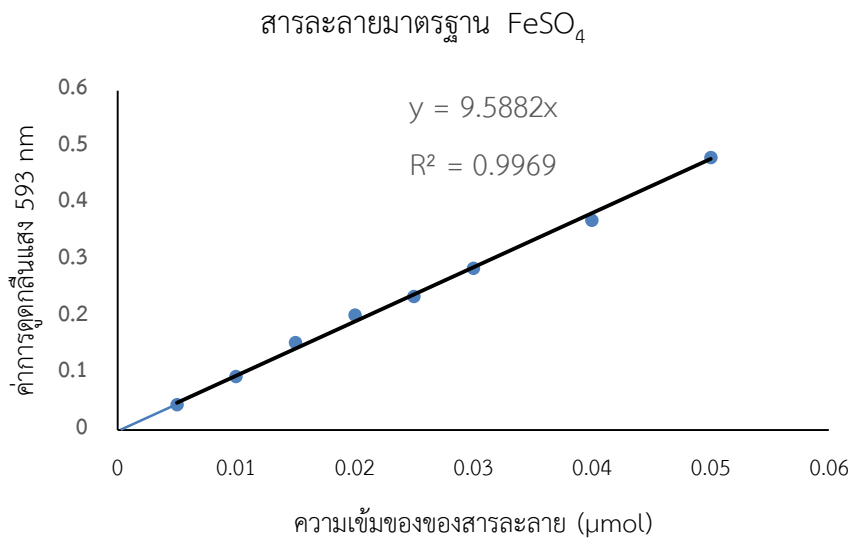
กราฟมาตรฐาน



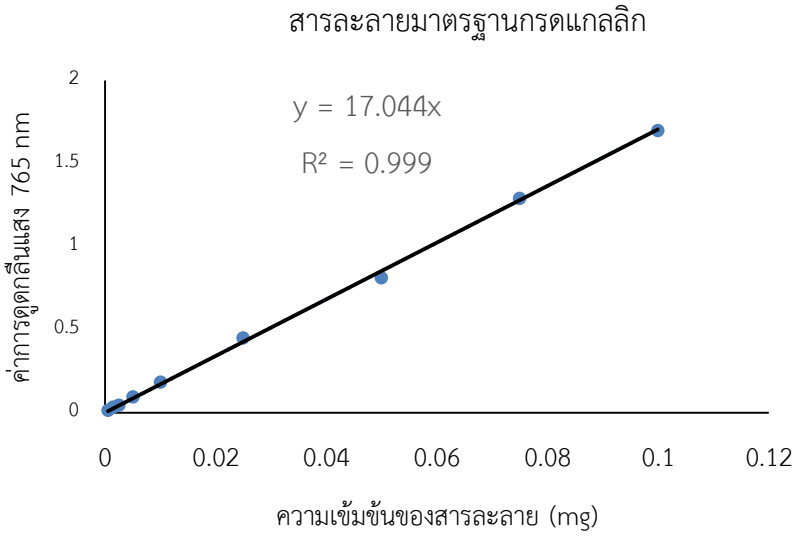
ภาพภาคผนวก ข.1 % DPPH radical scavenging



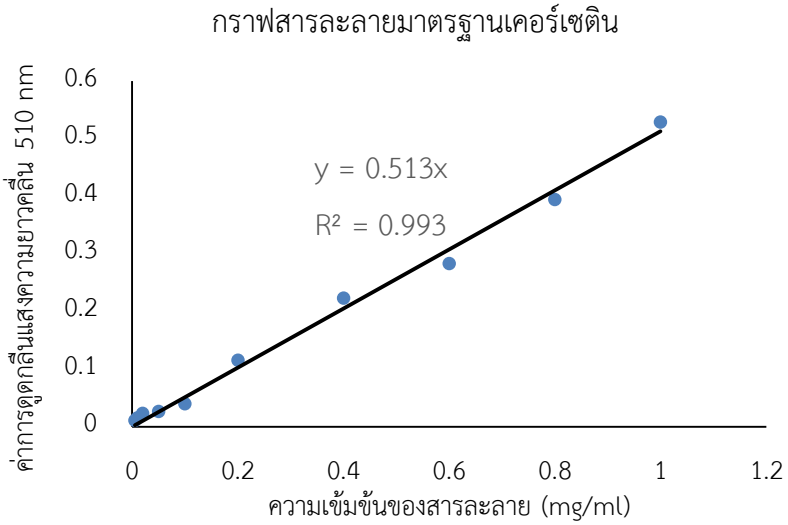
ภาพภาคผนวก ข. 2 % ABTS radical scavenging



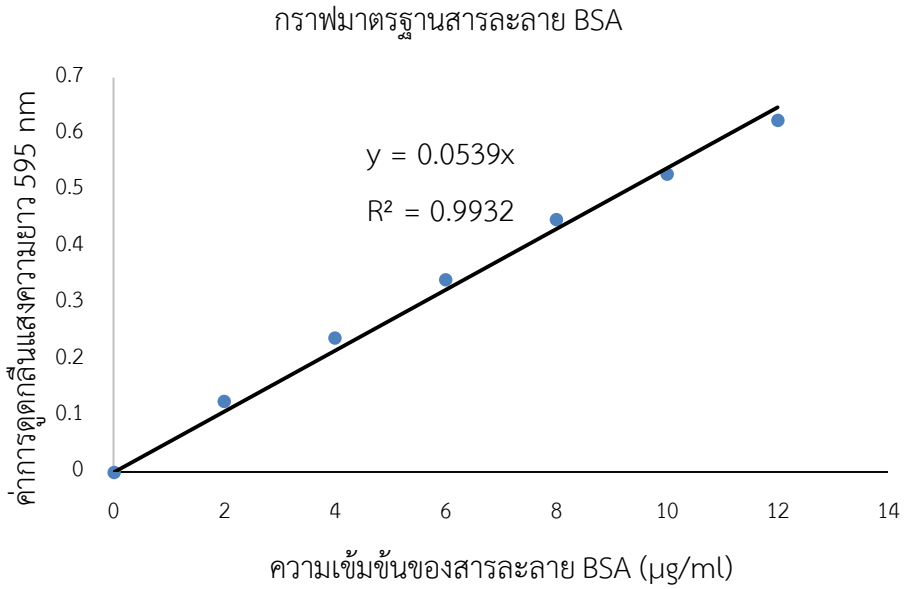
ภาพภาคผนวก ข. 3 ค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณเฟอรัสซัลเฟตที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 593 นาโนเมตร



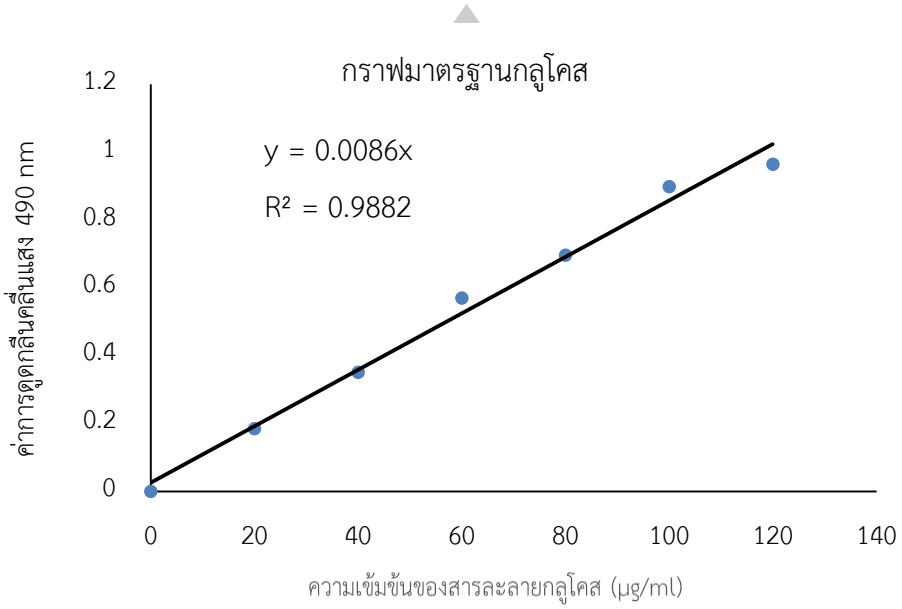
ภาพภาคผนวก ข. 4 ค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลของกรดแกลลิกที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 765 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวก ข. 5 ค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของเคอร์ซิตินที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 510 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวก ข. 6 ค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสาร BSA ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร

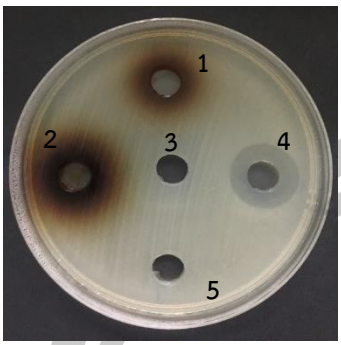


ภาพภาคผนวก ข. 7 ค่าการดูดกลืนแสงในการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของกลูโคสที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่นแสง 490 นาโนเมตร

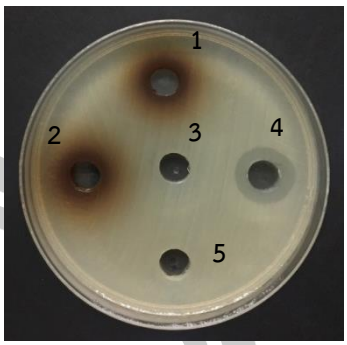
พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ภาคผนวก ค

รูปภาพแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด ภาพทดสอบหาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และแสดงภาพ phylogenetice tree

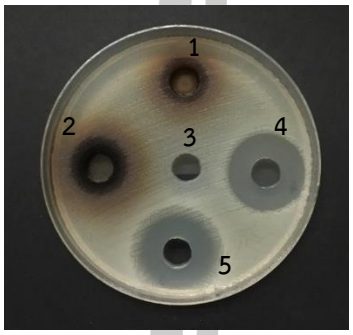


P. igniarius

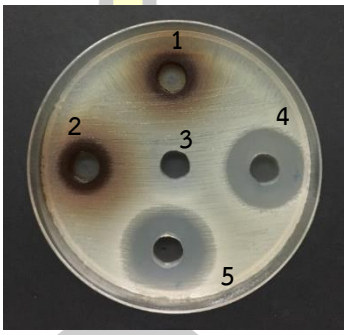


P. nigricans

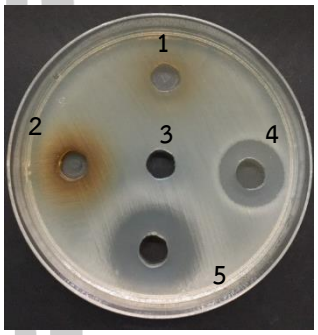
Proteus mirabilis (TISTR100)



P. igniarius

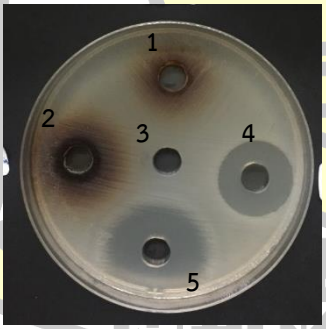


P. nigricans

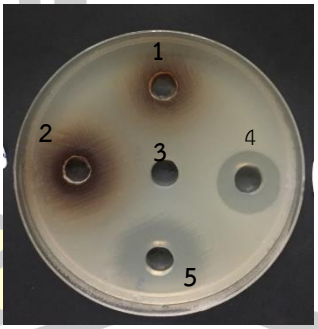


P. robustus

S. aureus (ATCC 25933)



P. igniarius

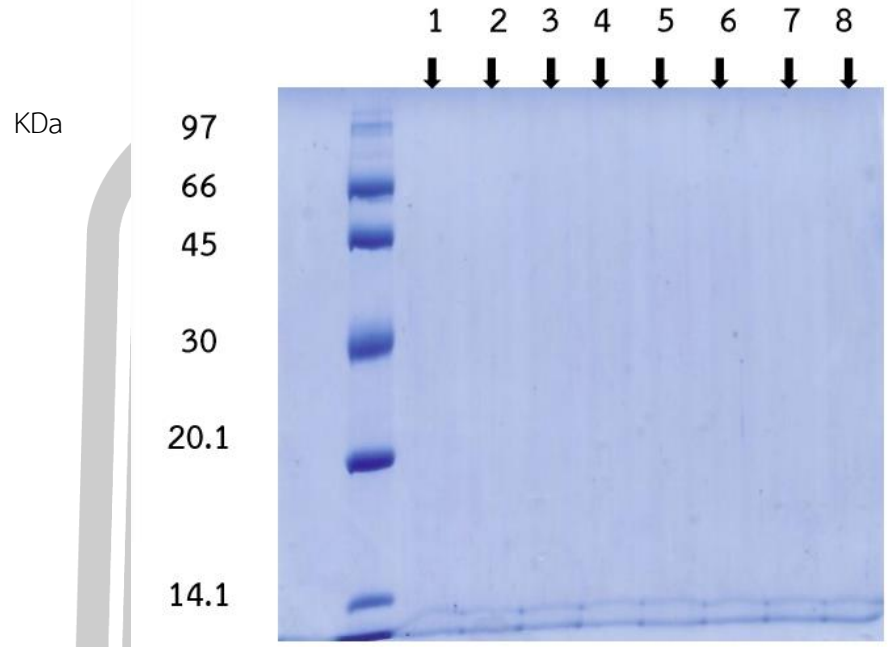


P. nigricans

S. epidermidis (TISTR 518)

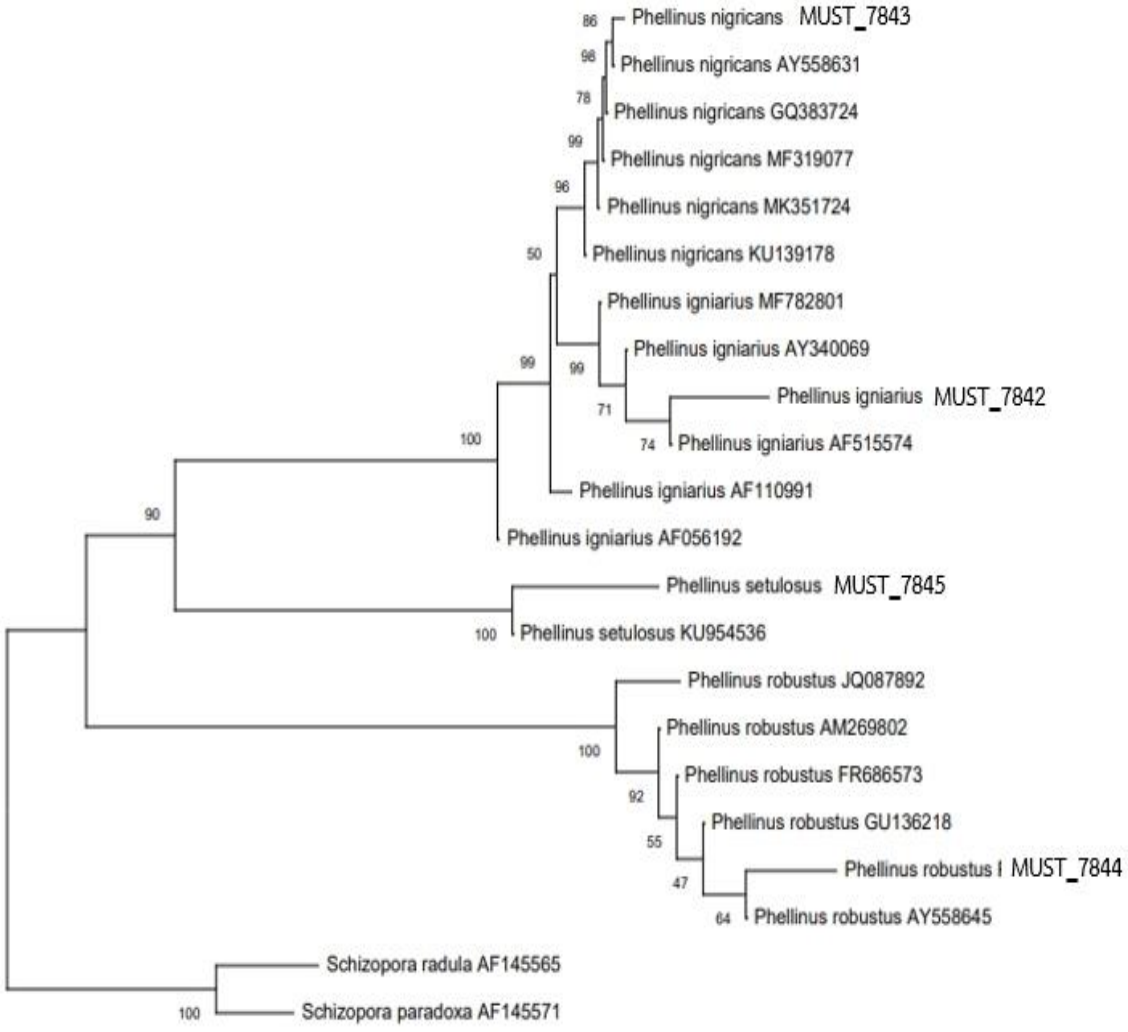
ภาพภาคผนวก ค.1 แสดงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวิธี Agar well diffusion

หมายเหตุ 1 = เส้นใย 2 = ดอก 3 = DMSO 4 = gentamycin 5 = tetracycline



ภาพภาคผนวก ค. 2 แสดงภาพทดสอบหาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE จากเส้นใยเห็ด (1 = *P. igniarius*, 2 = *P. nigricans*, 3= *P. robustus*, 4 = *P. setulosus*) และดอกเห็ด (5 = *P. igniarius*, 6 = *P. nigricans*, 7 = *P. robustus*, 8 = *P. setulosus*)

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



ภาพภาคผนวก ค.3 แสดงภาพ phylogenetice tree จาก *Phellinus* จำนวน 4 สายพันธุ์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปรียารัตน์ โยวะผุย
วันเกิด	วันที่ 17 มีนาคม พ.ศ.2525
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	338 หมู่ 11 ถนนสารคามวาปี ตำบลแวงน่าง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2536 ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนอนุบาลมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2542 มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม พ.ศ. 2547 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2550 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2562 ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปร.ด.) สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว