คุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง

โดย

นางสาวพิชญา ประเวชไพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

คุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง

โดย
นางสาวพิชญา ประเวชไพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

PREBIOTIC PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE*

By

MISS Pitchaya PRAWETPRI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (MICROBIOLOGY)

Department of MICROBIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	คุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง
โดย	นางสาวพิชญา ประเวชไพร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย (ผู้รักษาการแทน)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาธิต นิรัติศัย)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธงชัย เตโชวิศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุรารักษ์ ร่มรื่น)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร. ทักษวัน ทองอร่าม)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กมลชัย ชะเอม)

620720044 : จุลชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : เห็ดแครง, พรีไบโอติก, โพลีแซ็กคาไรด์, สารต้านอนุมูลอิสระ

นางสาว พิชญา ประเวชไพร: คุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน

เมื่อทำการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดแครง และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเมทานอลได้โพลีแซ็กคาไรด์ร้อยละ 0.21±0.11-1.30±0.06 เมื่อนำสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ไปศึกษาองค์ประกอบพบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดระหว่าง 0.635± 0.146-0.790± 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ มีน้ำตาลรีดิซว์ระหว่าง 0.415±0.030-0.508±0.059 มิลลิกรัมต่อมิลกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ มีปริมาณกลูโคซามีนระหว่าง 0.181± 0.003-0.249± 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดระหว่าง 0.001±0.001-0.006±0.000 มิลลิกรัมต่อมิลกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดระหว่าง 0.017±0.007-0.051±0.014 มิลลิกรัมต่อมิลกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ เมื่อศึกษาผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 พบว่าสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดและเส้นใยในถุงเห็ดสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. acidophilus* ได้ เมื่อนำอาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคพบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ไม่สามารถส่งเสริมความสามารถของโพรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ เมื่อทดสอบความทนทานของโพรไบโอติกที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง พบว่า *L. acidophilus* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดสามารถทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองได้ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS คิดเป็นร้อยละ 20-40 และ 2-7 ของ Trolox ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 macrophage และ ไรทะเล

620720044 : Major (MICROBIOLOGY)

Keyword : schizophyllum commune, prebiotic, polysaccharide, Antioxidant activity

MISS PITCHAYA PRAWETPRI : PREBIOTIC PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR EAKAPHUN BANGYEEKHUN, Ph.D.

Polysaccharide was extracted from the fruiting body, mycelium, mycelium from spent mushroom substrate of split gills mushroom, *schizophyllum commune*, and rubber wood sawdust by hot water and precipitated by methanal and yielded 0.21±0.11%-1.30±0.06%. The composition of polysaccharide was analyzed and revealed 0.635± 0.146-0.790± 0.033 mg of total carbohydrate/mg extract, 0.415±0.030-0.508±0.059 mg of reducing sugar/mg extract, 0.181± 0.003-0.249± 0.014 mg of glucosamine/mg extract, 0.001±0.001-0.006±0.000 mg of total phenolic content /mg extract and 0.017±0.007-0.051±0.014 mg of protein/mg extract. Effect of polysaccharides on growth of probiotic bacteria *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 was studied and indicated the polysaccharide extracted from mycelium and mycelium from spent mushroom substrate can stimulate the growth of *L. acidophilus*. Culture filtrate from probiotic bacteria grown in a medium containing polysaccharide could not inhibit growth of pathogenic bacteria. Only *L. acidophilus* grown in a medium containing polysaccharides extracts from mycelium could tolerate the tested gastrointestinal conditions. The polysaccharides also exhibited antioxidant activity. There were 20-40% and 2-7% of percentage inhibition of Trolox according to DPPH and ABTS assay, respectively. The polysaccharides were not toxic to RAW 264.7 macrophage cell line and *Artemia salina.*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก รศ. ดร. เอกพันธ์ บางยี่ขัน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ การแก้ไขปรับปรุงต่าง ๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ธงชัย เตโชวิศาล ผศ. ดร. อุรารักษ์ ร่มรื่น ดร. ทักษวัน ทองอร่าม และผศ. ดร. กมลชัย ชะเอม ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการ อีกทั้งยังให้คำแนะนำจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เสร็จสิ้นสมบูรณ์ รวมถึงอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้คำแนะนำเพิ่มเติมตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณกรพรรณ เศวตสุวรรณกุล นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านเครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์รวมทั้งการให้คำแนะนำต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ การสนับสนุน และเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เสร็จสิ้นสมบูรณ์

นางสาว พิชญา ประเวชไพร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

1. พรีไบโอติก (Prebiotics) 3

2. เห็ดแครง 4

3. พรีไบโอติกที่พบในเห็ด 6

4. กลูโคซามีน (Glucosamine) 8

5. โพลีแซ็กคาร์ไรด์ (Polysaccharides) 8

6. น้ำตาลรีดิวซ์ 10

7. โปรตีน 10

8. สารประกอบฟีนอลิก 11

9. การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test) 11

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 13

2. การเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครง 13

3.การเพาะเห็ดแครง 13

4. การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์.....14
5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต.....15
6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....15
7. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน.....15
8. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....16
9. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....16
10. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก.....16
11. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค (Pathogenic growth inhibition).....17
12. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง.....17
13. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging.....18
14. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay.....18
15. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage.....19
16. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล.....19
17. การวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC).....20
18. สถิติที่ใช้ในการทดลอง.....20
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....21
1. ปริมาณผลผลิตของเส้นในเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) และดอกเห็ดแครง.....21
2. ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์.....21
3. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด.....22
4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....22
5. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน.....22

6. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....23
7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด.....23
8. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก.....24
9. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค.....25
10. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง.....29
11. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด.....33
12. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage.....34
13. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล.....35
14. ผลการวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....35
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....37
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....41
รายการอ้างอิง.....44
ภาคผนวก ก.....50
ภาคผนวก ข.....54
ภาคผนวก ค.....59
ภาคผนวก ง.....60
ภาคผนวก จ.....61
ภาคผนวก ฉ.....63
ภาคผนวก ช.....65
ภาคผนวก ซ.....67
ภาคผนวก ด.....70

ภาคผนวก ต.....72
ภาคผนวก ถ.....73
ภาคผนวก ท.....76
ภาคผนวก น.....82
ภาคผนวก บ.....84
ภาคผนวก ป.....86
ภาคผนวก ผ.....90
ประวัติผู้เขียน.....101

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด 21

ตารางที่ 2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกลูโคซามีน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด.....23

ตารางที่ 3 ค่า OD620 ของ *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด 24

ตารางที่ 4 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-5 มา 48 ชั่วโมง.....26

ตารางที่ 5 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-11 มา 48 ชั่วโมง.....27

ตารางที่ 6 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. acidophilus* TISTR2365 มา 48 ชั่วโมง.....28

ตารางที่ 7 ความทนทานของเชื้อ *L. plantarum* MD-5 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง.....30

ตารางที่ 8 ความทนทานของเชื้อ *L. plantarum* MD-11 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง.....31

ตารางที่ 9 ความทนทานของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง 32

ตารางที่ 10 ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด 33

ตารางที่ 11 น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด 36

ตารางที่ 12 ปริมาณผลผลิตของเส้นในเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) และดอกเห็ดแครง 59

ตารางที่ 13 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด 60

ตารางที่ 14 การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid ของน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร 61

ตารางที่ 15 การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid 62

ตารางที่ 16 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) ของน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร 63

ตารางที่ 17 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) 64

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 65

ตารางที่ 19 ปริมาณกลูโคซามีนของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด.....66

ตารางที่ 20 การวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ของกรดแกลลิค โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร 67

ตารางที่ 21 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด 69

ตารางที่ 22 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารมาตรฐาน ด้วยวิธี Bradford ของ bovine serum albumin (BSA) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร 70

ตารางที่ 23 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Bradford 71

ตารางที่ 24 ค่า OD620 ของ *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด รวมถึงอินูลิน 72

ตารางที่ 25 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-5 มา 48 ชั่วโมง.73

ตารางที่ 26 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-11 มา 48 ชั่วโมง 74

ตารางที่ 27 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. acidophilus* TISTR2365 มา 48 ชั่วโมง 75

ตารางที่ 28 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* MD-5 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม.....76

ตารางที่ 29 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* MD-11 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม.....77

ตารางที่ 30 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. acidophilus* TISTR2365ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม 78

ตารางที่ 31 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. plantarum* MD-5 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม.....79

ตารางที่ 32 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. plantarum* MD-11 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม.....80

ตารางที่ 33 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. acidophilus* TISTR2365ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม.....81

ตารางที่ 34 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี DPPH.....82

ตารางที่ 35 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging 83

ตารางที่ 36 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี ABTS.....84

ตารางที่ 37 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay.....85

ตารางที่ 38 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage 86

ตารางที่ 39 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage 87

ตารางที่ 40 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage 88

ตารางที่ 41 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage 89

ตารางที่ 42 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล.....90

ตารางที่ 43 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล.....91

ตารางที่ 44 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล.....92

ตารางที่ 45 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล 93

ตารางที่ 46 ผลของ Potassium dichromate ต่อการมีชีวิตของไรทะเล 94

ตารางที่ 47 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมสารมาตรฐานฟรักโตส กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส และแลคโตสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC.....96

ตารางที่ 48 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 97

ตารางที่ 49 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 98

ตารางที่ 50 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 99

ตารางที่ 51 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 100

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ความเข้มข้น 15-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 34

ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ความเข้มข้น 7-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล สัญลักษณ์ a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 35

ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 61

ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสของการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) 63

ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคซามีน 65

ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคของการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay 68

ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ของการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford.....70

ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน ฟรักโตส กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 96

ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 97

ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 98

ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 99

ภาพที่ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 100

บทที่ 1
บทนำ

Gibson and Roberfroid (1995) เสนอแนวคิดเกี่ยวกับพรีไบโอติกเป็นครั้งแรก โดยได้อธิบายไว้ว่า พรีไบโอติก คือ ส่วนประกอบของอาหารที่มนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible food ingredients) แต่ส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น อินูลิน (Inulin) โอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) โอลิโกแลคโตส (oligolactose) แล็กทูโลส (lactulose) และคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ โดยพรีไบโอติกจะส่งผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือกิจกรรมของแบคทีเรียหรือกลุ่มแบคทีเรียอย่างจำเพาะ เช่น การเลี้ยง bifidobacteria และ lactobacilli ร่วมกับ galacto-oligosaccharides (GOS) โดยใช้ระบบจำลองของลำไส้ของมนุษย์เพื่อตรวจสอบผลของกาแลคโตลิโกแซ็กคาไรด์ต่อเอนไซม์ที่เป็นพิษต่อพันธุกรรม (genotoxic enzyme) พบว่า β-glucosidase, β-glucuronidase และ arylsulphatase ถูกยับยั้งอย่างรุนแรง (McBain and Macfarlane, 2001) และในการทดสอบให้ GOS แก่มนุษย์พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของ bifidobacteria และ lactobacilli ได้อีกด้วย (Ito et al., 1990) เมื่อทดสอบเพิ่ม galacto-oligosaccharides (GOS) ในอาหารของหนู (5 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม) พบว่าการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียมในหนูเพิ่มขึ้น (Chonan et al., 2001) รวมถึง Fructo-oligosaccharides (FOS) ที่ส่งผลกระทบต่อการดูดซึมแร่ธาตุ จากการทดสอบกับมนุษย์พบว่าเมื่อกิน FOS ปริมาณ 15 กรัมต่อวันหรืออินนูลิน 40 กรัมต่อวันช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม (Roberfroid, 2002) พรีไบโอติกยังมีผลต่อการควบคุมไขมัน จากการศึกษาในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าเมื่อให้ xylooligosaccharides (XOS) แทนคาร์โบไฮเดรตในอาหาร คอเลสเตอรอลในเลือดและไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในโรคเบาหวานลดลงและไตรกลีเซอรอลในตับเพิ่มขึ้นถึงระดับใกล้เคียงกับหนูปกติ (Imaizumi et al., 1991)

สามารถพบสารอาหารที่เป็นพรีไบโอติกได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง หัวบีท กระเทียม หัวหอม ข้าวสาลี น้ำผึ้ง กล้วย ข้าวบาร์เลย์ มะเขือเทศ ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง นม (Davani-Davari et al., 2019)นอกจากนี้เห็ดอีกหลายชนิด เช่น เห็ดนางรมขาว (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) มีคุณสมบัติเป็นแหล่งของพรีไบโอติก เนื่องจากเห็ดมีคาร์โบไฮเดรตประกอบไปด้วยโพลีแซ็กคาร์ไรด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์

ที่มนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ เช่น ไคติน เฮมิเซลลูโลส β และ α-กลู แคน มานแนน ไซแลน และกา แลคแทน เป็นต้น (Aida et al., 2009)

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกในเห็ดพบว่า สารสกัดจากน้ำที่ได้จากเห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) และ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*) สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus plantarum* (Sawangwan et al., 2018) สารสกัดโพลีแซ็กคาร์ไรด์จากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ได้ (Shaari et al., 2012) และสาร Soluble β-glucan ที่ได้จากดอกเห็ดหูหนู (*Auricularia auricula* Judae) และเห็ดแครง (*Schizophylum commune* Fries) สามารถกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* และพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกสร้าง SCFA ที่เป็น Acetate, propionate และ butyrate เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี Soluble β-glucan จากเห็ด (Chaikliang et al., 2015)

งานวิจัยนี้ให้ความสนใจต่อการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง ถึงแม้ว่าเห็ดแครงจะเพาะเลี้ยงได้ง่าย แต่ต้องใช้เวลามากถึง 60-90 วัน ในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทราบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลวและเส้นใยในวัสดุเพาะเห็ดเปรียบเทียบกับโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากดอกเห็ดโดยมีเป้าหมายในการลดระยะเวลาการผลิตโพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นพรีไบโอติกจากเส้นใยเห็ดแครง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พรีไบโอติก (Prebiotics)

(1) ฟรุกแทน (Fructans)

ฟรุกแทนประกอบด้วยอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide; FOS) หรือโอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) โครงสร้างเชิงเส้นของฟรุกโตสที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(2,1) โดยมีหน่วยของกลูโคสต่อท้ายและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(2,1) อินนูลินมี DP (degree of polymerization) สูงถึง 60 ในขณะที่ DP ของ FOS น้อยกว่า 10

(2) กาแลกโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Galacto-Oligosaccharides)

กาแลคโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Galacto-Oligosaccharides; GOS) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจากแลคโตส แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย กลุ่มแรก GOS ที่มีกาแลคโตสอยู่ที่ C3 , C4 หรือ C6 และกลุ่มที่สอง GOS ที่ผลิตจากแลคโตสผ่านเอนไซม์ทรานส์ไกลโคซิเลชัน (enzymatic trans-glycosylation) GOS ประเภทนี้เรียกอีกอย่างว่าทรานส์-กาแลคโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (trans-galacto-oligosaccharides; TOS)

(3) แป้ง (Starch) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้มาจากกลูโคส (Glucose-Derived Oligosaccharides)

Resistant starch (RS) เป็นแป้งชนิดหนึ่งที่ทนต่อการย่อยของลำไส้ส่วนบน RS สามารถกระตุ้นให้โพรไบโอติกผลิตบิวทีเรต (butyrate) ในระดับสูง

Polydextrose เป็น Glucose-Derived Oligosaccharides มีหลักฐานว่าสามารถกระตุ้น *Bifidobacterium* ได้ แต่ยังไม่ได้รับการยืนยัน

(4) โอลิโกแซ็กคาไรด์อื่น ๆ

โอลิโกแซ็กคาไรด์บางชนิดมีต้นกำเนิดมาจากโพลีแซ็กคาไรด์ที่เรียกว่าเพกตินโอลิโกแซ็กคาไรด์ประเภทนี้เรียกว่า pectic oligosaccharide (POS)

(5) สารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Non-Carbohydrate Oligosaccharides)

ฟลาโวนอลที่ได้จากโกโก้ ผลการทดลอง *In vivo* และ *In vitro* แสดงให้เห็นว่าฟลาโวนอล(flavanols) สามารถกระตุ้น Lactic acid bacteriaได้ประโยชน์ของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกสามารถเพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์บางกลุ่มในลำไส้ พรีไบโอติกยังให้ประโยชน์ต่อสุขภาพอีกมากมายในลำไส้ใหญ่ เช่น การเลี้ยง *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ร่วมกับ galacto-oligosaccharides (GOS) โดยใช้ระบบจำลองของลำไส้ของมนุษย์เพื่อตรวจสอบผลของกาแลคโตลิโกแซ็กคาไรด์ต่อเอนไซม์ที่เป็นพิษต่อพันธุกรรม (genotoxic enzyme) พบว่า β-glucosidase, β-glucuronidase และ arylsulphatase ถูกยับยั้งอย่างรุนแรง (McBain and Macfarlane, 2001) และในการทดสอบให้ GOS แก่มนุษย์พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ได้อีกด้วย (Ito et al., 1990) นอกจากนั้นเมื่อทดสอบเพิ่ม galacto-oligosaccharides (GOS) ในอาหารของหนู (5 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม) พบว่าการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียมในหนูเพิ่มขึ้น (Chonan et al., 2001) รวมถึง Fructo-oligosaccharides (FOS) ที่ส่งผลกระทบต่อการดูดซึมแร่ธาตุ จากการทดสอบกับมนุษย์พบว่าเมื่อกิน FOS ปริมาณ 15 กรัมต่อวันหรืออินูลิน 40 กรัมต่อวันช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม (Roberfroid, 2002) พรีไบโอติกยังมีผลต่อการควบคุมไขมัน จากการศึกษาในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าเมื่อให้ xylooligosaccharides (XOS) แทนคาร์โบไฮเดรตในอาหาร คอเลสเตอรอลในเลือดและไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในโรคเบาหวานลดลงและไตรกลีเซอรอลในตับเพิ่มขึ้นถึงระดับใกล้เคียงกับหนูปกติ (Imaizumi et al., 1991)

2. เห็ดแครง

เห็ดแครง (*Schizophyllum commune* Fries) เป็นเห็ดที่จัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycota ตระกูล Schizophyllaceae จีนัส Schizophyllum ดอกเห็ดขึ้นกระจัดกระจายตามขอนไม้และกิ่งไม้ ดอกเห็ดมีขนาดกว้าง 1 ถึง 4 เซนติเมตร พื้นผิวด้านบนถูกปกคลุมไปด้วยขนเล็ก ๆ สีขาวถึงสีเทาครีบมีลักษณะพับและแยกออกตรงกลางจากโคนคล้ายพัดมีสีขาวถึงเทาแตกตามยาว (split gilled) ก้านดอกมีขนาดเล็กสีเหมือนหมวกเห็ด เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเรียบ งอเล็กน้อยและแคบที่ฐาน (Kusrinah and Kasiamdari, 2017; Padhiar et al., 2009)

วงจรชีวิตของเห็ดแครง

สปอร์เห็ดที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid spore) จะงอกและเจริญเป็นเส้นใย (mycelium) ซึ่งมีนิวเคลียสเดี่ยวเรียกว่า โมโนคาริออน (monokaryon) การผสมพันธุ์เกิดขึ้นจากการรวมตัวของเส้นใยของโมโนคาริออนที่แตกต่างกัน แต่ยังไม่เกิดการรวมกันของนิวเคลียส ทำให้เส้นใยมีนิวเคลียสเดี่ยวสองนิวเคลียสต่อเซลล์ เรียกว่า ไดคาริออน (dikaryon) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมเส้นใยไดคาริออนจะสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ซึ่งมีส่วนของดอก ก้านและครีบเห็ด เซลล์ที่อยู่บนครีบเห็ดเรียกว่า basidia จะเกิดการรวมกันของนิวเคลียสเป็นเซลล์ที่มีโครโซมโซมสองชุด (diploid cell) และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้เป็น 4 นิวเคลียสและพัฒนาไปเป็นเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ที่มี 1 นิวเคลียส เบสิดิโอสปอร์สามารถกระจายได้ด้วยลมและสามารถงอกและเจริญเป็นเส้นใยโมโนคาริออนต่อไป (Nieuwenhuis and Aanen, 2018)

ขั้นตอนการเพาะปลูกเห็ดแครง

การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ด

นำดอกเห็ดที่ได้มาทำความสะอาด จากนั้นแบ่งดอกเห็ดออกเป็นสองซีก นำเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านในวางลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดย้ายลงอาหาร Potato Dextrose Agar อีกครั้ง

การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดใส่ลงในข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยเจริญเติบโตเต็มขวด

เตรียมวัสดุเพาะ

เริ่มจากผสมขี้เลื่อย 100 กิโลกรัม รำข้าว 5 กิโลกรัม ยิบซั่ม 2 กิโลกรัม ปูนขาว 1 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.2 กิโลกรัม เข้าด้วยกันจากนั้นปรับความชื้นให้ได้ 65-75% จากนั้นนำไปแบ่งใส่ถุงพลาสติกขนาด 6.5x12.5 นิ้ว ถุงละ 900 กรัมจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ไว้ให้เย็นแล้วใส่หัวเชื้อของเห็ดแครง ต่อมาวางถุงในห้องเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 1- 1.5 เดือน จนเส้นใยเจริญจนเต็มถุง ย้ายไปวางในห้องที่ช่อง

ระบายอากาศและแสงพอประมาณ จากนั้นเปิดดอกเห็ดและให้น้ำอย่างเหมาะสม (Arunyik Mushroom Center, 2016)

เห็ดแครงเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ทางยาอีกด้วย (Acharya *et al.,* 2016) มีการทดสอบโดยใช้สารสกัด (1⟶3)-β-D-glucan จากเส้นใยเห็ดร่วมกับเคมีบำบัดและการฉายรังสี เพื่อรักษามะเร็งปากมดลูกและมะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่าก้อนมะเร็งมีขนาดลดลง (Hobbs, 2005) และจากการทดสอบสารสกัดหยาบจาก ethyl acetate และ chloroform ของเห็ดแครงพบว่า ประกอบด้วย อัลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ และสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HeLa, MCF7, T47D และ WiDr โดยสารสกัดหยาบจากคลอโรฟอร์ม สามารถยับยั้งเซลล์ T47D ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC50 = 5.44 ug/mL และสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (Ekowati *et al.,* 2020)

3. พรีไบโอติกที่พบในเห็ด

Sawangwan et al. (2018)ทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกในเห็ดที่สามารถรับประทานได้ในเห็ด 7 ชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู (*Auricularia auricula*-judae) เห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) เห็ดนางรมสีชมพู (Pleurotus *djamor*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดนางรม *(Pleurotus ostreatus* (Jacq.Fr.) Kummer) และเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*) โดยสกัดสารจากเห็ดด้วยน้ำและเอทานอลในอัตราส่วน 1:4 แล้วนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ความทนทานต่อระบบทางเดินอาหาร และการกระตุ้นการเจริญของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* หลังการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยเปรียบเทียบกับ Control และพรีไบโอติกทางการค้า FOS และอินูลิน พบว่า culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยง *L. acidophilus* ในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.Fr.) Kummer) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. paratyphi* ซึ่งมี inhibition zone เท่ากับ 0.8750 ± 0.0354 ซม. 0.7500 ± 0.0707 ซม. และ 1.1500 ± 0.0707 ซม. ตามลำดับ รวมถึง culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหารที่ผสมสารสกัดจากเห็ดหูหนู (*Auricularia auricula*-judae) และเห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ซึ่งมี inhibition zone เท่ากับ 1.1000 ± 0.1414 ซม. และ 0.9500 ± 0.0707 ซม. ตามลำดับ ในการทดสอบความทนทานต่อระบบ

ทางเดินอาหาร จากการเลี้ยง *L. plantarum* และ *L. acidophilus* กับอาหารที่มีสารสกัดจากเห็ดในสภาวะที่มี alpha-amylase, bile extract และ HCl เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าโพรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์สามารถทนต่อ HCl และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าในสภาวะอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง L. acidophilus ในอาหารที่มีสารสกัดจากเห็ดนางรมสีชมพู (*Pleurotus djamor*) มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดคือ 13.64% และโพรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ที่มีในอาหารที่มีสารสกัดจากเห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงทั้งสองสายพันธุ์ ในการทดสอบการกระตุ้นการเจริญของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* พบว่าสารสกัดจากเห็ดทุกชนิดที่นำมาทดสอบสามารถกระตุ้นการเจริญของ *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ได้โดยเฉพาะ *L. acidophilus* ในอาหารที่มีสารสกัดจากเห็ดหอม (*Lentinus edodoes*) มีค่า OD เท่ากับ 1.9779 ± 0.0032 และ *L. plantarum* ในอาหารที่มีสารสกัดจากเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*) ค่า OD เท่ากับ 1.9702 ± 0.0072 จากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติพรีไบโอติกมีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับ FOS และอินูลิน

Shaari et al. (2012) ทำการทดสอบโดยเลี้ยงโพรไบโอติกร่วมกับสารสกัดจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ได้แก่ สารสกัดหยาบโพลีแซ็กคาไรด์ (crude polysaccharides; GLCP) และ Polysaccharide-fraction number 2 (PF-2) พบว่า *Bifidobacterium* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 0.3 และ 0.7 log10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รวมถึง *Lactobacillus* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น 0.7 และ 1 log10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยง *Salmonella* ร่วมกับสารสกัดพบว่าเจริญเติบโตลดลง 0.3 และ 0.5 log10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ control *G. lucidum* มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก

Chaikliang et al. (2015) ได้ทดสอบ Soluble β-glucan ที่ได้จากเห็ดหูหนู (*Auricularia auricula* Judae) โดยเลี้ยง *Bifidobacterium* และ *lactobacillus* ร่วมกับ soluble β-glucan พบว่าแบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับ control โดยค่า PI (Prebiotic index) ของ soluble β-glucan และ oligo-β-glucan จากเห็ดหูหนู (*Auricularia auricula* Judae) มีค่าเท่ากับ 0.11 และ -0.07 ตามลำดับ และสารจากเห็ดแครง (*Schizophylum commune* Fries) เท่ากับ 0.01 และ -0.01 ตามลำดับ ในขณะที่ PI ของ β-glucan จากยีสต์เชิงพาณิชย์ (*Saccharomyces cerevisiae*) มีค่าเท่ากับ 0.03 และเมื่อทดสอบหาปริมาณ SCFA หลังจากถูกหมักโดย *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* พบว่า acetate ถูกพบมากที่สุดตามด้วย propionate, butyrate

และ lactate ตามลำดับ จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่า β-glucan จาก *Schizophylum commune* Fries และ *Auricularia auricula* Judae มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติก

4. กลูโคซามีน (Glucosamine)

กลูโคซามีนคือน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) สังเคราะห์จากกลูโคสและกลูตามีน เป็นแหล่งของ glucosamine-6-phosphate และ n-acetylglucosamine (Papich, 2016) กลูโคซามีนเป็นอาหารเสริมที่รู้จักกันดีในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม มีผลทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย รวมทั้งคุณสมบัติต้านการอักเสบ (antiinflammatory) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ชะลอวัย (antiaging) ปกป้องหัวใจ (cardioprotective) chondroprotective ปกป้องตับ และ cytoprotective เป็นต้น(Jamialahmadi, 2019) สามารถพบได้ในเปลือกปู ล็อบสเตอร์ และกุ้ง รวมถึงผนังเซลล์ของเห็ดอีกด้วย (Lim et al., 2019; Zhang and Sutheerawattananonda, 2020)

การวัดปริมาณกลูโคซามีน (GlcN) สามารถทำได้โดยดีพอลิเมอร์ (depolymerized) และดีอะซีไทเลต (deacetylated) ไคตินด้วยสารละลาย HCl ทำให้ได้ GlcN จากนั้นทำการรีดิวซ์ด้วย Mo(VI) (สารละลายที่มี NaOH, Na_2SiO_3, Na2MoO4, CH_3COOH และสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ เป็นองค์ประกอบ) ทำให้อยู่ในรูปแอนไอออนโมลิบโดซิลิเกต (molybdosilicate anion) ที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณกลูโคซามีนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) เป็นสารมาตรฐาน(Katano et al., 2016)

5. โพลีแซ็กคาร์ไรด์ (Polysaccharides)

โพลีแซ็กคาร์ไรด์เป็นโพลีเมอร์ของโมโนแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ตัวอย่างเช่น เซลลูโลส แอลจิเนต (alginate) เพคติน (pectin) dextran และ Glucans เป็นต้น โพลีแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ จากการศึกษาพบว่าโพลีแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก (anti-tumour) กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory effect) ต้านการเจริญของจุลชีพ (antimicrobial activity) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant activity) ลดปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือด (antidiabetic) ต้านไวรัส (antiviral

activities) และป้องกันระดับน้ำตาลในเลือดสูง (Anti-hyperglycemic) โพลีแซ็กคาไรด์สามารถหาได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น พืช จุลินทรีย์ สาหร่าย และสัตว์ (Mohammed et al., 2021)

การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดมีด้วยกันหลายวิธี โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ

(1) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction method) ใช้น้ำร้อน (hot water) สารละลายด่าง (alkali solution) และ polyethylene glycol

(2) Microwave ultrasonic หรือ ultrahigh pressure

(3) การสกัดด้วยเอนไซม์ (enzyme-assisted extraction method)

การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อน (hot water) เป็นวิธีการที่นิยมที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม แต่พบว่ามีสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ เช่น โปรตีน สารประกอบฟีนอลิก โมโนแซ็กคาไรด์ และกรดอะมิโนปนเปื้อนมาด้วย จึงมีขั้นตอนการนำสารที่ปนเปื้อนออกจากโพลีแซ็กคาไรด์ เช่น การตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติก (Trichloroacetic acid; TCA) แล้วจึงทำให้โพลีแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (Koontz, 2014; Zhu et al., 2014)

คาร์โบไฮเดรตคือ polyhydroxy aldehydes (aldoses) หรือ polyhydroxy ketones (ketoses) ที่ประกอบด้วย C, H และ O คาร์โบไฮเดรตถูกจำแนกเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ และโพลีแซ็กคาไรด์ (Blanco and Blanco, 2017) จึงทำการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate determination) ด้วยวิธีกรดฟีนอล-ซัลฟิวริก (the phenol-sulfuric acid method) เป็นการวัดสี (colorimetric method) ที่ง่ายและรวดเร็วในการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในตัวอย่าง ซึ่งมีหลักการดังนี้โดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นสลายคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นเฟอร์ฟูรัล และเฮกโซส (สารประกอบคาร์บอน 6 ตัว) เป็นไฮดรอกซีเมทิล เฟอร์ฟูรัล (hydroxymethyl furfural) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ทำปฏิกิริยากับฟีนอลทำให้ได้สีเหลืองทอง และคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน (Nielsen, 2010)

6. น้ำตาลรีดิวซ์

น้ำตาลรีดิวซ์คือคาร์โบไฮเดรตที่ถูกออกซิไดซ์โดย weak oxidizing agent (ตัวออกซิไดซ์ที่สามารถออกซิไดซ์อัลดีไฮด์ แต่ไม่ใช่แอลกอฮอล์ เช่น Tollen's reagent**)** ในสารละลายที่เป็นน้ำ คุณสมบัติเฉพาะของน้ำตาลรีดิวซ์คือ ในตัวกลางที่เป็นน้ำ พวกมันจะสร้างสารประกอบตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไปที่มีหมู่อัลดีไฮด์ เช่น α-D-glucose β-D-glucose α-D-fructose และ maltose

วัดได้โดยวิธีการ 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method) หลักการของวิธีการนี้คือ หมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับหมู่ฟังชั่น ketonic และ aldehyde ของน้ำตาล fructose และ glucose ตามลำดับ โดย 3, 5-Dinitrosalicylic acid ที่มีสีเหลือง ไปจนถึง 3-amino-5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้มแดง ในตัวกลางที่เป็นด่าง และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Jain et al., 2020)

7. โปรตีน

โปรตีนคือโมเลกุลขนาดใหญ่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากที่เชื่อมต่อกันเป็นสาย มีกรดอะมิโนประมาณ 20 ชนิดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในโปรตีน โปรตีนที่มีหน้าที่คล้ายกันจะมีลำดับของกรดอะโมคล้ายกัน จึงสามารถใช้องค์ประกอบในการระบุหน้าที่ของโปรตีนได้จากคุณสมบัติของกรดอะมิโน โปรตีนมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการทางเคมีที่จำเป็นต่อชีวิต เช่น เอนไซม์ซึ่งใช้เร่งปฏิกิริยาเมตาบอลิซึม ฮอร์โมน และฮีโมโกบินที่ใช้ขนส่งออกซิเจนในเลือด รวมถึงโปรตีนโครงสร้าง (Scleroproteins) เช่น คอลลาเจนซึ่งเป็นโครงสร้างของกระดูก เส้นเอ็น และผิวหนัง เคราตินที่เป็นโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุผิวในชั้นนอกสุดของผิวหนังพบได้ในเส้นผม เล็บ กีบและขนนก แหล่งของโปรตีนทั่วไปสามารถพบได้ในเนื้อสัตว์ ไข่ และนม เป็นต้น(Haurowitz and Koshland, 2020) มีวิธีการมากมายในการวัดปริมาณโปรตีน ตัวอย่างเช่น การหาปริมาณไนโตรเจน พันธะเปปไทด์ กรดอะมิโนอะโรมาติก ความสามารถในการจับสีย้อม (dye-binding capacity) การดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet absorptivity) และคุณสมบัติการกระเจิงของแสง การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยม โดยผสมสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 กับสารละลายโปรตีน สีย้อมจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน และการดูดกลืนแสงของสีย้อมจะเปลี่ยนจากความยาวคลื่น

465 เป็น 595 นาโนเมตร จึงสามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างได้จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (Jain et al., 2020)

8. สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มของโมเลกุลขนาดเล็กที่มีลักษณะโครงสร้างที่มีหน่วยฟีนอลอย่างน้อยหนึ่งหน่วย ตามโครงสร้างทางเคมี สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยต่าง ๆ เช่น กรดฟีนอล (phenolic acids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แทนนิน (tannins) คูมาริน (coumarins) ลิกแนน (lignans) ควิโนน (quinones) สติลเบน (stilbens) และเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) (Gan et al., 2019) สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic activity) (Saranraj et al., 2019) สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของพืช ผัก ผลไม้ และเห็ด เป็นต้น (Cheung, 2010; De La Rosa et al., 2019)

วัดสารประกอบฟีนอลิกได้โดยวิธีการ Folin-Ciocalteu colorimetric โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำปฏิกิริยากับ Folin reagent ที่ได้จาก sodium tungstate และ sodium molybdate ในตัวกลางที่เป็นกรดได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองที่สามารถรีดิวซ์ได้ด้วยสารประกอบฟีนอลิก และสามารถวัดการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (Lizcano et al., 2019)

9. การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity test)

การทดสอบความเป็นพิษเป็นการประเมินอย่างเป็นระบบของผลกระทบที่เป็นอันตรายจากสาร โดยทดลองกับเซลล์และสัตว์เพื่อประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับมนุษย์โดยไม่ต้องใช้ผู้เข้ารับการทดลองที่เป็นมนุษย์

โดยการศึกษาความเป็นพิษแบ่งออกเป็น

(1) การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity studies)

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเป็นการประเมินความเสี่ยงของสารเคมีต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่ไม่ใช่เป้าหมาย (non-target environmental organisms) ทำได้โดย

การให้สารทดสอบกับสัตว์ทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่สามารถส่งผลให้ 50% ของสัตว์ทดลองเสียชีวิต (50% lethal dose; LD50) ซึ่งเป็นการประมาณค่าความเป็นพิษของสารเคมีและการวางแผนการทดสอบอื่น ๆ

(2) การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (sub-acute toxicity studies)

การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันเป็นการตรวจสอบผลกระทบจากสารเคมีภายใต้สถานการณ์ที่เป็นจริงมากกว่าการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน เพื่อระบุระบบอวัยวะที่ได้รับผลกระทบ ผลจากการสะสมของสาร และปริมาณสารสูงสุดที่ยอมรับได้ (MTD) เป็นต้น ซึ่งเป็นการศึกษาการได้รับและสัมผัสซ้ำ ๆ ระหว่าง 28 ถึง 90 วัน

(3) การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity studies)

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังจะต้องกำหนดอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากสารทดสอบหรือการก่อมะเร็งเมื่อให้สารทดสอบตลอดอายุไขของสัตว์ทดลอง การทดสอบนี้ใช้เวลานานและใช้สัตว์ทดลองปริมาณมาก

(Arome and Chinedu, 2013; Hulla et al., 2014; Vandivort and Eaton, 2014)

การทดสอบความเป็นพิษต่อ cell line

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity tests) สามารถวัดค่าได้จาก ความมีชีวิตของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือผลจากการเผาผลาญเป็นตัวบ่งชี้ถึงศักยภาพที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษทางผิวหนัง เป็นต้น วิธีการที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ การทดสอบ neutral red (การวัดความมีชีวิตของเซลล์และความเสียหายของเมมเบรน) การทดสอบ Coomassie blue และ Kenacid blue (การวัดการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณโปรตีนทั้งหมด) การทดสอบ MTT หรือ tetrazolium (การวัดการทำงานของไมโตคอนเดรีย) และ cellular leakage of lactate dehydrogenase (การวัดการบาดเจ็บของเซลล์)(Baran, 2014) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay มีหลักการดังนี้ การทดสอบนี้วัดความมีชีวิตของเซลล์ในแง่ของ reductive activity โดยการรีดิวซ์สารประกอบ tetrazolium ไปเป็นผลึก formazan ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งมีสีม่วงโดย dehydrogenases ที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต โดย formazan สามารถวัดการดูดกลืนที่ 500 ถึง 600 นาโนเมตร (Kuete et al., 2017)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เลี้ยงเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) สายพันธุ์ DOA-2 จากกรมวิชาการเกษตร ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาในข้าวฟ่าง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เลี้ยง *Lacyobacillus acidophilus* สายพันธุ์ TISTR 2365 *Lacyobacillus plantarum* MD-5 และ *Lacyobacillus plantarum* MD-11 ด้วยความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. ทักษวัน ทองอร่าม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในบนอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และเก็บรักษาในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เลี้ยงจุลินทรีย์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TISTR887 *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TISTR292 *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ TISTR 885 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ TISTR687 ที่ได้จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครง

เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA; HIMEDIA, India)) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นและถ่ายชิ้นวุ้นจำนวน 5 ชิ้น ลงบนอาหารสูตร Mushroom Completed Medium (MCM) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 380 มิลลิลิตร (3.7 x 8.0 x 15.0 เซนติเมตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กรองเพื่อแยกเส้นใย แล้วจึงอบเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ คำนวณหาปริมาณเส้นใยแห้งต่อลิตร

3.การเพาะเห็ดแครง

เตรียมหัวเชื้อข้าวฟ่างโดยนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำ 1 คืน แล้วจึงนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที กรองแยกข้าวฟ่างและผึ่งให้เมล็ดข้าวฟ่างแห้งพอหมาด ใส่ข้าวฟ่างลงในขวดปริมาณ 3/4 ของขวด

นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงถ่ายเชื้อเห็ดแครงลงในข้าวฟ่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ถ่ายหัวเชื้อข้าวฟ่างใส่ลงในถุงเห็ด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน เปิดถุงเห็ดเพื่อให้เกิดดอกเห็ดโดยการกรีดเฉียงตามแนวถุงให้ได้ 5 รอยด้วยมีด บันทึกน้ำหนักเห็ด คำนวนหาร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพ (%Biological Efficiency) โดยหาได้จากสมการ

%BE = (น้ำหนักสดของเห็ด/น้ำหนักแห้งของวัสดุเพาะเห็ด)×100

4. การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

สกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ดัดแปลงจาก Chou et al. (2013) และ Guo et al. (2003) โดยนำดอกเห็ด เส้นใยเห็ดและเส้นใยในถุงเห็ด มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งคงที่ นำตัวอย่างแห้งมาบดเป็นผงด้วยครก แล้วจึงนำไปสกัดในน้ำเดือดโดยใช้อัตราส่วน 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเพื่อแยกกากและนำน้ำที่ได้มาผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะเซติกที่ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนที่อยู่เหนือตะกอนผสมกับเมทานอลอัตราส่วน 1:4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนโพลีแซ็กคาไรด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอน นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง จากนั้นบันทึกน้ำหนักแห้งของโพลีแซ็กคาไรด์ที่ได้ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนที่อยู่เหนือตะกอนผสมกับเมทานอลอัตราส่วน 1:4 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนโพลีแซ็กคาไรด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอน นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง จากนั้นบันทึกน้ำหนักแห้งของโพลีแซ็กคาไรด์ที่ได้

5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก โดยผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และฟีนอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที เขย่า 30 วินาที แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ความเข้มข้น 0-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Albalasmeh et al., 2013)

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดด้วยกรด 3,5-ไดนิโทรซาลิไซลิก (DNSA) จาก (Miller, 1959) โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรด 3,5-ไดนิโทรซาลิไซลิก (DNS) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.63 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) กลูโคส

7. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยใช้วิธีของ Katano et al. (2016) นำดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยครก ต่อมานำตัวอย่าง 10 มิลลิกรัม ผสมเข้ากับสารละลายไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) ที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารออกมา 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย Mo(VI) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าที่

ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) กลูโคซามีน (N-acetylglucosamine)

8. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ตามวิธีทดลองของ Wong et al. (2013) โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรกับ Folin-Ciocalteu ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na2CO3) ที่ความเข้มข้น 700 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับ Standard curve ของสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) กรดแกลลิก (Gallic acid)

9. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

การทดสอบหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford ตามวิธีทดลองของ Kruger (2009) โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างในน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ Bradford reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับ Standard curve ของสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

10. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก

การทดสอบสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก ดัดแปลงจากวิธีของ Sawangwan et al. (2018) เลี้ยง *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 *L. plantarum* MD-5 *L. plantarum* MD-11 บนอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อใช้เป็นตัวแปรควบคุม จากนั้นเลี้ยง L. acidophilus และ L. plantarum บนอาหาร MRS broth ที่มีสารสกัด ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใช้ inulin แทนสารสกัดเป็นตัวเปรียบเทียบ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อหาค่าความหนาแน่นของเซลล์

11. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค (Pathogenic growth inhibition)

ทดสอบสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ดัดแปลงจาก Sawangwan et al. (2018) เลี้ยง *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 *L. plantarum* MD-5 *L. plantarum* MD-11 โดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น คือ $1x10^6$ ใน MRS broth ที่มีสารสกัดจากเห็ด ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสด้านบนกับตะกอนเซลล์ นำส่วนใสด้านบนไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคซึ่งได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ TISTR 887 *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TISTR292 *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ TISTR 885 และ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ TISTR 2372 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาตรโดยใช้ 0.5 McFaland แล้วจึง swab ลงในอาหาร Nutrient agar (NA) ดูดส่วนใสด้านบนใส่ลงบนอาหารที่เจาะด้วย cock boler ขนาด 0.7 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใส่ส่วนใส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารที่มีแบคทีเรียก่อโรค นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสโดยการเปรียบเทียบจากจานอาหารที่ไม่มีสารสกัดจากเห็ด (ชุดควบคุม)

12. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

ทดสอบโดยการเลี้ยง *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 *L. plantarum* MD-5 *L. plantarum* MD-11 บนอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อใช้เป็นตัวแปรควบคุม แล้วเลี้ยง *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 *L. plantarum* MD-5 และ *L. plantarum* MD-11 บนอาหาร MRS broth ที่มีสารสกัดจากเห็ด ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่

ไม่มีออกซิเจน นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างอีกสองรอบด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ ที่ความเข้มข้น 0.5% ดูดน้ำเกลือออก นำตะกอนเชื้อที่ได้ เติมน้ำย่อยเทียม (gastric juices) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0 15 30 60 90 และ180 นาที แล้ว spread plate ลงบน MRS Agar จากนั้นนับจำนวนเซลล์ ทำแบบเดียวกับอีกครั้งโดยใช้น้ำดีเทียม (bile juices) แทนน้ำย่อยเทียม (gastric juices) โดยดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0 และ 240 นาที ดัดแปลงจาก Blaiotta et al. (2013) และ Sawangwan et al. (2018)

13. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ตามวิธีทดลองของ Butkhup et al. (2018) ผสมสารละลาย DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine) ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ใน ethanol ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ชุดควบคุมใช้น้ำแทนสารสกัดและชุดควบคุมที่เป็น Blank ใช้น้ำแทนสารละลาย DPPH) เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในความมืดเป็นเวลา 60 นาที และนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ

% Inhibition = [(Ac-(As-Ab))/ Ac] x 100 (เมื่อ Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เป็น Blank)

14. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ปรับปรุงจาก Xiao et al. (2020) เตรียมสารละลาย ABTS -+ โดยผสมสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 วางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ และนำสารละลาย ABTS -+ มาเจือจางในเมทานอลและนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.7 แล้วจึงผสมสารสกัดโพลีแซ็กคา

ไรด์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS -+ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (ชุดควบคุมใช้น้ำแทนสารสกัดและชุดควบคุมที่เป็น Blank ใช้น้ำแทนสารละลาย ABTS -+) ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระโดยใช้สมการ

% Inhibition = [(Ac-(As-Ab))/ Ac] x 100 (เมื่อ Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของตัวควบคุม As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง และ Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เป็น Blank)

15. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจาก Taechowisan et al. (2020)โดยการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 macrophage ในอาหาร RPMI 1640 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)) ที่ความเข้มข้น 5% ทดสอบโดยใช้ 96 well-plate โดยเซลล์ถูกเลี้ยงลงในแต่ละหลุมจำนวน 2x105 ต่อหลุม โดยแต่ละหลุมมี RPMI 1640 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มี fetal bovine serum (FBS) เข้มข้น 10% บ่มข้ามคืน (overnight) จากนั้นละลายสารสกัดในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) โดยเซลล์ถูกบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวกลางที่ปราศจาก FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในการสอบวิเคราะห์ทั้งหมดไม่เกิน 0.1% ล้างเซลล์หนึ่งครั้งก่อนที่จะเติมอาหารที่ปราศจาก FBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่มี 5- (4, 5-Dimethylthiazol 2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดอาหารทิ้งแล้วละลายฟอร์มาซานสีน้ำเงินซึ่งก่อรูปในเซลล์ด้วย DMSO ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดความหนาแน่นของแสงที่ 570 นาโนเมตร หาร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยคำนวณได้จากสมการ

Percentage (%) of cell viability = (A570 of treated cells)/ (A570 of control cells) ×100

16. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล

การทดสอบการรอดชีวิตของไรทะเล (brine shrimp cytotoxicity bioassay) โดยดัดแปลงมาจาก Wakawa and Fasihuddin (2017) โดยนำ Artemia salina cysts ปริมาณ 1.5 กรัม ใส่ลงในภาชนะ

ที่บรรจุน้ำทะเลเทียมผ่านการกรอง ปริมาตร 1 ลิตร ติดตั้งปั๊มลมเข้ากับน้ำเพื่อเติมอากาศให้ซีสต์ รวมถึงการติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซนส์เพื่อให้แสงสว่าง โดยอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 27-29 องศาเซลเซียส หลังจาก 48 ชั่วโมงของการฟักตัว ไรทะเลจะเริ่มว่ายน้ำอยู่บริเวณด้านล่างของภาชนะ แล้วนำไปทดสอบทางชีวภาพ เตรียมสารสกัดละลายในสารละลาย DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และละลายในน้ำทะเลเทียมโดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 7-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดที่เตรียมปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไรทะเลจำนวน 10 ตัว และนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนไรทะเลที่รอดชีวิตโดยจำนวนไรทะเลที่ตายนำมาพลอตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดแล้วคำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตของไรทะเล โดยใช้ Potassium dichromate ในน้ำทะเลเทียมที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 7-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control และทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลได้รับการอนุญาตจากคณะกรรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-08536-2562)

17. การวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ ผ่านเครื่อง HPLC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น Nexera LC 40 series โดยใช้ Refractive Index เป็น Detector มี 80% acetonitrile เป็น mobile phase อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้สารมาตรฐาน คือ ฟรักโตส กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส

18. สถิติที่ใช้ในการทดลอง

การทดลองถูกวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA และ Turkey's test ด้วยโปรแกรมสถิติ JASP เวอร์ชั่น 0.16.3.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ปริมาณผลผลิตของเส้นในเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) และดอกเห็ดแครง

จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 33.093±4.238 กรัมต่อลิตร

การเพาะเห็ดแครงในขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นระยะเวลา 45 วัน มีค่าร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพ (%BE) เท่ากับ 2.33±0.12

2. ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

จากการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์โดยต้มตัวอย่าง (ดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด) ในน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.21-1.30 โดยดอกเห็ดมีปริมาณผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 1.30±0.06 ขณะที่เส้นใยในถุงเห็ดมีปริมาณผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่ำที่สุดคือ ร้อยละ 0.21±0.11 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	ร้อยละผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์
ดอกเห็ด	1.30±0.06 b
เส้นใยเห็ด	1.11±0.31 b
เส้นใยในถุงเห็ด	0.21±0.11 a
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	0.25±0.06 a

สัญลักษณ์ a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 0.635-0.790 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยขี้เลื่อยถุงเห็ดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุดคือ 0.790± 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่ดอกเห็ดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุดคือ 0.635± 0.146 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 2)

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ด้วยกรด 3,5-ไดนิโทรซาลิไซลิก (DNS) พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.415-0.508 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยดอกเห็ดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 0.508±0.059 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่เส้นใยเห็ดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุดคือ 0.415±0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 2)

5. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนจากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ด้วยสารละลาย Mo (VI) พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 0.181-0.249 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยขี้เลื่อยถุงเห็ด มีปริมาณกลูโคซามีนมากที่สุดคือ 0.249± 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่เส้นใยเห็ดมีปริมาณกลูโคซามีนต่ำที่สุดคือ 0.181± 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 2)

6. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu colorimetric พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณฟีนอลิกอยู่ในช่วง 0.001-0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยเส้นใยเห็ดมีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดคือ 0.006±0.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่ถุงเห็ดมีปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุดคือ 0.001±0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 2)

7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่างโดยวิธี Bradford พบว่า ตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 0.017-0.051 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยเส้นใยเห็ดมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 0.051±0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่ถุงเห็ดมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดคือ 0.017±0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกลูโคซามีน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณโปรตีนทั้งหมด ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (mg /mg extract)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg /mg extract)	ปริมาณกลูโคซามีน (mg /mg extract)	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg/mg extract)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (mg/mg extract)
ดอกเห็ด	0.635± 0.146a	0.508±0.059b	0.191± 0.002c	0.004±0.000fg	0.050±0.013h
เส้นใยเห็ด	0.741± 0.059a	0.415±0.030b	0.181± 0.003c	0.006±0.000g	0.051±0.014h
เส้นใยในถุงเห็ด	0.666± 0.056a	0.434±0.003b	0.229± 0.013d	0.003±0.001f	0.045±0.022h
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	0.790± 0.033a	0.426±0.036b	0.249± 0.014d	0.001±0.001e	0.017±0.007h

สัญลักษณ์ a-h แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

8. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัส พบว่า อาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของ *L. plantarum* MD-5 และ *L. plantarum* MD-11 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ขณะที่สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดและเส้นใยในถุงเห็ด มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญ *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ โดยมีค่า OD เท่ากับ 0.539±0.050 และ 0.640± 0.080 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่า OD620 ของ *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	OD620		
	L. plantarum MD-5	*L. plantarum* MD-11	*L. acidophilus* TISTR2365
MRS	1.202±0.007ab	1.249±0.007g	0.355± 0.059k
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1.275±0.031b	1.363±0.002h	0.461±0.010kl
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	1.218±0.055ab	1.086±0.007d	0.203± 0.013j
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	1.307±0.032b	1.105±0.006e	0.539±0.050l
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1.157±0.016a	0.889±0.000c	0.640± 0.080l
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1.163±0.034a	1.211±0.010f	0.054±0.002i

สัญลักษณ์ a-l แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

9. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

เมื่อทำการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัสร่วมกับสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า อาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่สามารถส่งเสริมความสามารถของ *L. plantarum* MD-5 *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-5 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
	B. cereus TISTR687	*E. coli TISTR887*	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR885
MRS	0.7±0.0a	0.0±0.0b	0.5±0.1c	0.0±0.0d
MRS+10 mg/ml Inulin จาก Chicory	0.9±0.2a	0.0±0.0b	0.5±0.1c	0.0±0.0d
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	0.7±0.1a	0.0±0.0b	0.3±0.1c	0.0±0.0d
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	0.8±0.0a	0.0±0.0b	0.3±0.1c	0.0±0.0d
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	0.8±0.1a	0.0±0.0b	0.4±0.0c	0.0±0.0d
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	0.7±0.1a	0.0±0.0b	0.3±0.1c	0.0±0.0d

สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-11 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
	B. cereus TISTR687	*E. coli* TISTR887	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR885
MRS	0.7±0.1a	0.0±0.0c	0.3±0.1e	0.0±0.0f
MRS+10 mg/ml Inulin จาก Chicory	0.9±0.1b	0.0±0.0c	0.3±0.0e	0.0±0.0f
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	0.6±0.1ab	0.0±0.0c	0.0±0.0d	0.0±0.0f
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	0.8±0.1a	0.0±0.0c	0.3±0.1e	0.0±0.0f
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	0.7±0.0a	0.0±0.0c	0.2±0.2de	0.0±0.0f
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	0.6±0.1a	0.0±0.0c	0.2±0.1de	0.0±0.0f

สัญลักษณ์ a-f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ผ่านการเลี้ยง *L. acidophilus* TISTR2365 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
	B. cereus TISTR687	*E. coli TISTR887*	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR*885*
MRS	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	0.1±0.2a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	0.0±0.0a	0.0±0.0b	0.0±0.0c	0.0±0.0d

สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

10. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

จากการเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกในอาหาร MRS ที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง และนำมาศึกษาความทนทานของเชื้อโพรไบโอติกต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในน้ำย่อยเทียมเป็นเวลา 0-180 นาที และน้ำดีเทียมเป็นเวลา 0-240 นาที พบว่า *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดสามารถทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ในขณะที่สภาวะอื่น ๆ ไม่ส่งเสริมให้จุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสทนทานต่อระบบทางเดินอาหารจำลอง (ตารางที่ 7- 9)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 7 ความทนทานของเชื้อ *L. plantarum* MD-5 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลลินทรีย์ (log cfu/ml)							
	น้ำย่อยเทียม (pH 2)						น้ำดีเทียม (pH 8)	
	0 (นาที)	15 (นาที)	30 (นาที)	60 (นาที)	90 (นาที)	180 (นาที)	0 (นาที)	240 (นาที)
MRS	9.39±9.25 (100.00±0.00a)	8.88±8.27 (42.03±27.29b)	7.96±7.72 (5.64±4.81de)	4.00±3.42 (0.00±0.00f)	2.85±2.87 (0.00±0.00h)	2.14±1.40 (0.00±0.00i)	9.89±9.50 (100.00±0.00j)	9.21±8.78 (21.42±3.10l)
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	9.77±8.18 (100.00±0.00a)	8.89±7.42 (13.3±0.36b)	6.68±5.74 (0.08±0.01d)	4.24±2.80 (0.00±0.00f)	3.23±1.91 (0.00±0.00h)	2.37±1.32 (0.00±0.00i)	9.88±0.00 (100.00±0.00j)	7.85±6.40 (0.94±0.03k)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	9.38±8.46 (100.00±0.00a)	8.82±8.43 (27.43±8.65b)	5.91±5.86 (0.04±0.03d)	2.43±2.39 (0.00±0.00f)	0.00±0.00 (0.00±0.00h)	0.00±0.00 (0.00±0.00i)	10.12±9.87 (100.00±0.00j)	9.78±9.43 (49.44±9.31m)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	9.80±9.37 (100.00±0.00a)	8.94±8.60 (14.28±7b)	8.03±7.53 (1.88±0.87d)	4.87±5.10 (0.00±0.00f)	2.36±1.98 (0.00±0.00h)	1.88±1.86 (0.00±0.00i)	9.81±9.32 (100.00±0.00j)	9.04±8.66 (19.37±13.01l)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	8.97±8.11 (100.00±0.00a)	8.97±7.40 (99.82±14.2c)	8.03±7.67 (11.82±6.1e)	5.54±5.46 (0.04±0.03g)	4.67±4.84 (0.01±0.01h)	2.05±1.79 (0.00±0.00i)	10.17±9.24 (100.00±0.00j)	8.66±7.84 (3.08±0.25kl)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	9.20±8.80 (100.00±0.00a)	8.51±8.43 (28.12±31.04b)	6.12±5.92 (0.1±0.07d)	3.72±3.17 (0.00±0.00f)	1.90±1.86 (0.00±0.00h)	1.22±1.46 (0.00±0.00i)	9.71±9.05 (100.00±0.00j)	8.20±7.24 (3.22±0.78kl)

สัญลักษณ์ a-m แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 8 ความทนทานของเชื้อ *L. plantarum* MD-11 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลลินทรีย์ (log cfu/ml)							
	น้ำย่อยเทียม (pH 2)						น้ำดีเทียม (pH 8)	
	0 (นาที)	15 (นาที)	30 (นาที)	60 (นาที)	90 (นาที)	180 (นาที)	0 (นาที)	240 (นาที)
MRS	10.62±8.92 (100.00±0.00a)	9.30±7.48 (4.84±0.16e)	8.68±7.61 (8.68±7.61n)	4.44±3.18 (0.00±0.00j)	4.03±2.67 (0.00±0.00k)	2.68±1.24 (0.00±0.00l)	9.82±8.58 (100.00±0.00m)	9.75±8.59 (83.8±9.97o)
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	10,67±9.09 (100.00±0.00a)	8.63±7.46 (0.91±0.06c)	8.00±6.76 (8.00±6.76m)	3.13±0.76 (0.00±0.00j)	2.69±1.66 (0.00±0.00k)	2.59±1.42 (0.00±0.00l)	9.74±8.67 (100.00±0.00m)	9.03±7.00 (19.44±1.77n)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	9.92±8.71 (100.00±0.00a)	8.79±7.30 (7.42±0.22f)	6.37±5.40 (6.37±5.40k)	3.95±2.36 (0.00±0.00j)	3.37±2.35 (0.00±0.00k)	2.43±1.30 (0.00±0.00l)	10.03±8.64 (100.00±0.00m)	9.19±8.32 (14.61±1.66n)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	10.49±8.61 (100.00±0.00a)	8.61±7.24 (1.32±0.04d)	6.70±5.06 (6.70±5.06l)	4.40±2.86 (0.00±0.00j)	3.94±2.72 (0.00±0.00k)	2.04±1.24 (0.00±0.00l)	10.02±8.49 (100.00±0.00m)	9.12±7.91 (12.60±1.09n)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	10.06±8.77 (100.00±0.00a)	7.73±6.85 (0.47±0.06b)	6.69±5.40 (6.69±5.40l)	2.94±1.54 (0.00±0.00j)	2.67±1.40 (0.00±0.00k)	2.52±1.72 (0.00±0.00l)	9.95±8.62 (100.00±0.00m)	8.85±7.61 (8.00±0.84n)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	10.64±8.99 (100.00±0.00a)	8.53±7.18 (0.77±0.02bc)	6.65±5.24 (6.65±5.24l)	3.39±2.18 (0.00±0.00j)	2.64±1.32 (0.00±0.00k)	1.67±0.76 (0.00±0.00l)	10.00±8.82 (100.00±0.00m)	9.09±7.55 (12.37±0.97n)

สัญลักษณ์ a-o แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 9 ความทนทานของเชื้อ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีอินูลิน สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ต่อความทนทานในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลินทรีย์ (log cfu/ml)							
	น้ำย่อยเทียม (pH 2)						น้ำดีเทียม (pH 8)	
	0 (นาที)	15 (นาที)	30 (นาที)	60 (นาที)	90 (นาที)	180 (นาที)	0 (นาที)	240 (นาที)
MRS	9.79±9.59 (100.00±0.00a)	9.66±9.52 (79.02±24.35c)	8.41±7.86 (5.89±4.09de)	8.10±7.59 (2.86±1.88fg)	6.84±5.74 (0.19±0.19h)	5.29±3.80 (0.01±0.01k)	9.97±9.04 (100.00±0.00m)	8.07±6.97 (1.26±0.21p)
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	9.10±8.18 (100.00±0.00a)	8.67±8.06 (36.66±6.05bc)	8.14±7.10 (11.08±2.22e)	7.71±6.90 (4.10±0.65g)	7.19±6.06 (1.22±0.20i)	5.52±5.18 (0.03±0.01k)	9.11±8.42 (100.00±0.00m)	6.92±6.32 (0.64±0.03o)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	8.94±7.55 (100.00±0.00a)	8.75±7.06 (65.71±3.02c)	7.28±5.85 (2.20±0.02d)	6.90±5.42 (0.93±0.06f)	5.26±3.98 (0.02±0.00h)	3.61±3.02 (0.00±0.00k)	8.90±8.00 (100.00±0.00m)	5.87±4.93 (0.09±0.01n)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	9.39±8.18 (100.00±0.00a)	8.94±8.18 (34.97±4.11b)	8.16±6.18 (5.90±0.43de)	8.15±6.49 (5.72±0.39g)	7.94±6.69 (3.56±0.05j)	6.60±5.54 (0.16±0.02l)	9.45±8.32 (100.00±0.00m)	7.59±6.54 (1.39±0.21q)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	10.20±9.33 (100.00±0.00a)	10.13±8.96 (86.97±8.59c)	8.40±7.02 (1.62±0.18d)	8.05±6.24 (0.72±0.10f)	7.52±6.01 (0.21±0.03h)	6.31±5.08 (0.01±0.00k)	10.15±8.78 (100.00±0.00m)	8.16±6.56 (1.04±0.06p)
MRS+10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	8.60±8.00 (100.00±0.00a)	7.45±6.48 (7.36±2.19b)	7.44±6.40 (7.14±1.76de)	6.60±6.00 (1.07±0.52f)	5.46±4.56 (0.08±0.03h)	4.07±3.03 (0.00±0.00k)	8.67±7.76 (100.00±0.00m)	5.68±4.80 (0.11±0.03n)

สัญลักษณ์ a-q แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

11. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 27.69±2.74 และสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 17.33±1.54 (ตารางที่ 10)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 7.13±2.01 และสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 2.53±2.21 (ตารางที่ 10)

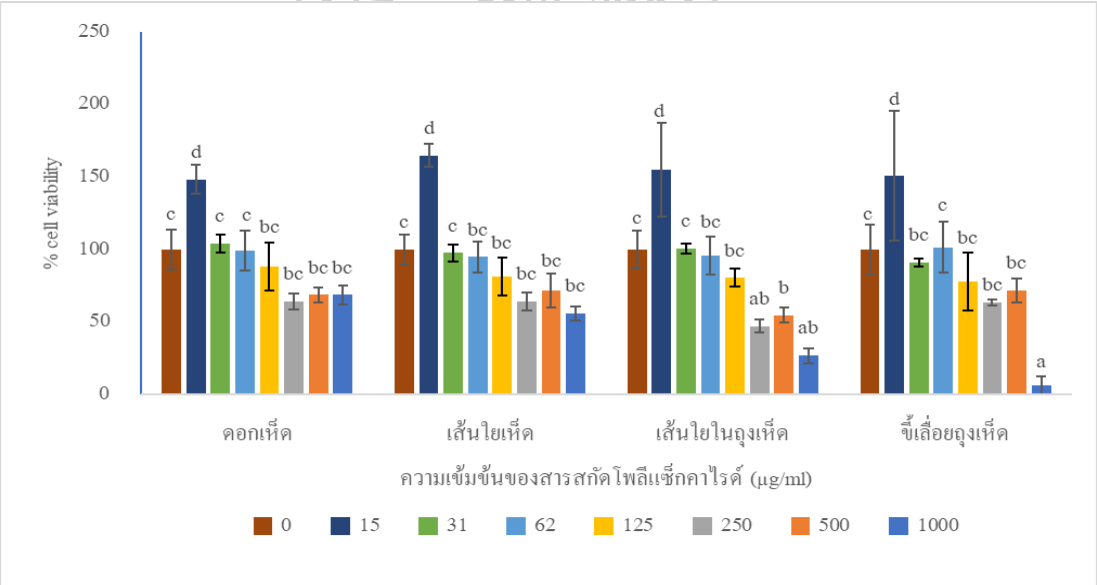
ตารางที่ 10 ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	วิธี DPPH (%inhibition)	วิธี ABTS (%inhibition)
ดอกเห็ด (1 mg/ml)	19.68±12.41a	7.13±2.01d
เส้นใยเห็ด (1 mg/ml)	27.69±2.74a	2.53±2.21c
เส้นใยในถุงเห็ด (1 mg/ml)	31.75±5.07a	3.17±0.63cd
ขี้เลื่อยถุงเห็ด (1 mg/ml)	17.33±1.54a	4.65±1.79cd
Trolox (0.25 mg/ml)	80.69b	99.15e

สัญลักษณ์ a-e แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

12. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

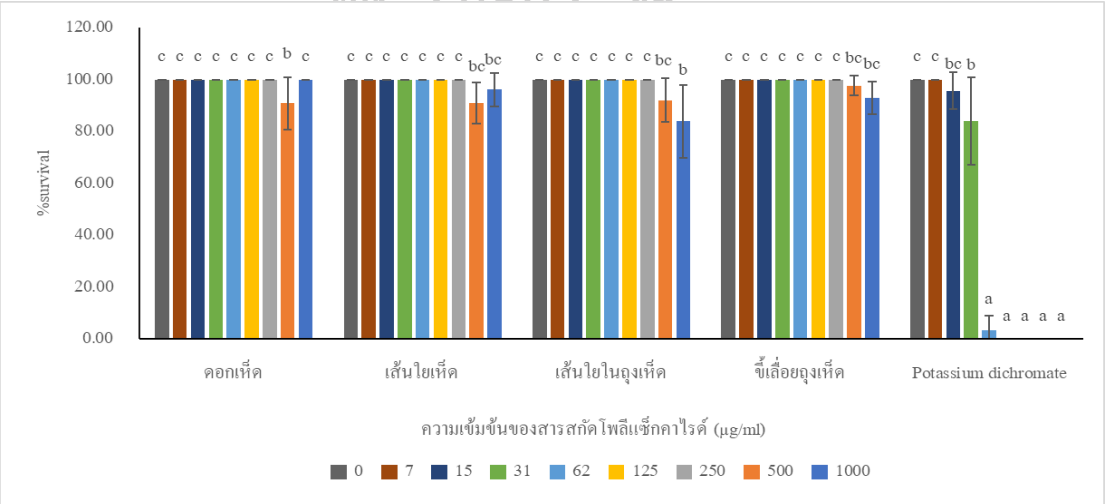
เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage ด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดและเส้นใยเห็ดที่ความเข้มข้น 15-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 15-125 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 15-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ RAW 264.7 macrophage มากกว่าร้อยละ 50 แต่สารสกัดจากโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 250 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เซลล์ RAW 264.7 macrophage มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 26.84± 5.29, 47.26±4.61 และ 6.38± 6.11 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 15-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage สัญลักษณ์ a-d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

13. ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล

เมื่อทำการทดสอบผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ 4 ตัวอย่าง ต่อการมีชีวิตของไรทะเล (brine shrimp cytotoxicity bioassay) พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ความเข้มข้น 7-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ไรทะเลมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงร้อยละ 83.97±13.91-100.00±0.00 โดยสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดชีวิตต่ำสุดอยู่ที่ร้อยละ 83.97±13.91 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด ที่ความเข้มข้น 7-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการรอดชีวิตของไรทะเล สัญลักษณ์ a-c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

14. ผลการวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธี HPLC ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ใน 4 ตัวอย่าง (ดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด) พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด และเส้นใยในถุงเห็ด ประกอบไปด้วย น้ำตาลกาแลคโตส ปริมาณ 0.530±0.028 0.540±0.220 และ 0.361±0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ และไม่

พบน้ำตาลฟรักโตส กลูโคส ซูโครส มอลโตส รวมถึงแลคโตส ขณะที่ขี้เลื่อยถุงเห็ดไม่พบน้ำตาลชนิดใดเลย (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม					
	ฟรักโตส	กลูโคส	กาแลคโตส	ซูโครส	มอลโตส	แลคโตส
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	ND	ND	0.530±0.028	ND	ND	ND
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	ND	ND	0.540±0.220	ND	ND	ND
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	ND	ND	0.361±0.044	ND	ND	ND
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND คือ Not Detected

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหาร MCM ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 380 มิลลิลิตร (3.7 x 8.0 x 15.0 เซนติเมตร) ในสภาวะที่ไม่เขย่า เป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 33.093±4.238 กรัมต่อลิตร แต่จากผลการวิจัยของ Kizilcik and Yamaç (2010) ที่เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงด้วยอาหาร MCM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วัน พบว่า มีปริมาณน้ำหนักแห้ง 6.43 กรัมต่อลิตร มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการเขย่าด้วยความเร็วที่เหมาะสมเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ดแบบคราวเดียว (batch culture) (Narkprasom et al., 2012) ในการทดลองนี้เป็นการเลี้ยงแบบไม่เขย่า แต่ได้ผลผลิตสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขวดที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดเป็นขวดแบน (3.7 x 8.0 x 15.0 เซนติเมตร) และวางขวดแบบแนวนอน ทำให้อาหารในขวดมีความสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร และเมื่อถ่ายเชื้อเห็ดลงไปแล้ว เส้นใยเห็ดที่เจริญจากหัวเชื้อมีโอกาสสัมผัสกับผิวหน้าของอาหารทำให้เส้นใยสามารถรับออกซิเจนได้โดยตรง และอาจเป็นผลทำให้เส้นใยเจริญดี ได้ผลผลิตของเส้นใยสูง

ในการเพาะเห็ดในขี้เลื่อยไม้ยางพาราของการทดลองนี้ได้ผลผลิตเห็ดคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพ (% Biological Efficiency) เท่ากับร้อยละ 2.33±0.12 แต่จากการทดลองของ (รัฐพล ศรประเสริฐ และสยาม อรุณศรีมรกต, 2014) ที่เพาะเลี้ยงเห็ดแครงในขี้เลื่อยไม้ยางพาราได้ผลผลิตเห็ดคิดเป็นร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพเท่ากับร้อยละ 48.78 ซึ่งค่าร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการให้ความชื้นระหว่างการเปิดดอกน้อยเกินไป

Chen et al. (2020) ทำการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดแครงโดยการต้มด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และตกตะกอนด้วยเอทานอล ได้ปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ร้อยละ 8.26 ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการทดลองนี้ ที่สกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง (ดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ดและขี้เลื่อยถุงเห็ด) โดยการต้มในน้ำร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และตกตะกอนโปรตีนออกด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติก จากนั้นจึงตกตะกอนโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยเมทานอล ทำให้ได้ผลผลิตร้อยละ 0.2-1.3 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตกตะกอนโปรตีนทำให้ได้ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ลดลง

และการใช้กรดไตรคลอโรอะเซติกที่ความเข้มข้นสูงมีแนวโน้มที่จะส่งผลให้ได้สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ลดลงเช่นกัน (Li et al., 2019)

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.635-0.790 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ หรือคิดเป็นร้อยละ 63.5-79.0 ซึ่งมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับรายงานของ Chen et al. (2020) ที่ทำการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดแครงและพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 67.96 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วง 0.415-0.508 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ มีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 0.184-0.249 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ หรือคิดเป็นร้อยละ 18.4-24.9 และค่าที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Sietsma and Wessels (1977) ที่พบว่าผนังเส้นใยของเห็ดแครงมีปริมาณ (N-acetyl) glucosamine อยู่ร้อยละ 12.5 ในการทดลองนี้พบว่าสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 0.249 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ แต่ในธรรมชาติสามารถพบ (N-acetyl) glucosamine ได้ในเปลือกของสัตว์ขาปล้อง รวมทั้งแมลง หอย และผนังเซลล์ของเชื้อรา (Satitsri and Muanprasat, 2020) และไม่ควรพบในขี้เลื่อย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสีของสารสกัดที่รบกวนการวัดการดูดกลืนแสง ทำให้ค่าที่ได้มีความแปรปรวนสูง

Gibson et al. (2010) ให้คำนิยามพรีไบติกไว้ว่า (1) เป็นสารอาหารที่มีความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไม่ควรถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร (2) ถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ (3) กระตุ้นการเจริญเติบโตหรือกิจกรรมของแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ ซึ่งส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้านดีขึ้น จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกพบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดสามารถกระตุ้นการเจริญของ *L. acidophilus* TISTR2365 และส่งผลให้ *L. acidophilus* TISTR2365 ทนทานต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง เท่านั้น จึงสรุปได้ว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก

Chaikliang et al. (2015) ได้ทำการสกัด β-glucan จากเห็ดแครงด้วยน้ำภายใต้แรงดัน 270 kPa อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-90 นาที และทำให้เป็นผงโดยการใช้ spary dryer และสกัด oligo-β-glucan โดยการบ่มสารสกัด β-glucan ด้วยเอนไซม์ laminarinase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 และ12 ชั่วโมง และทำให้เป็นผงโดยการใช้ spary dryer และทดสอบความ

เป็นพรีไบโอติกของสารสกัดโดยการศึกษาค่า prebiotic index และ การผลิตกรดไขมันสายสั้น พบว่า β-glucan จากเห็ดแครงมีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติก ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้แตกต่างจากผลการทดลองของ Chaikliang et al. (2015) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันและอาจทำให้ได้โพลีแซ็กคาไรด์ต่างประเภทกัน

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า มีค่าร้อยละของการยับยั้งที่แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH มีค่าร้อยละของการยับยั้งอยู่ในช่วง 17.33±1.54-31.75±5.07 และวิธี ABTS มีค่าร้อยละของการยับยั้งอยู่ในช่วง 2.53±2.21-7.13±2.01 จากปริมาณตัวอย่าง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากงานวิจัยของ Thetsrimuang et al. (2011) ที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Lentinus sp*. พบว่า การทดสอบด้วยวิธี ABTS ให้ค่าการยับยั้งมากกว่าวิธี DPPH ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการทดสอบทั้งสองวิธี อาจเนื่องจากการทดสอบทั้งสองวิธีมีอนุมูลอิสระที่เป็นเป้าหมายแตกต่างกัน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัว ต่างจากวิธี ABTS ที่เป็นอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซี ซึ่งต้องมีการทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ ABTS กับ potassium persulfate ก่อน (สุชาดา มานอก และปวีนา ลิ้มเจริญ, 2015) ABTS จึงทำให้ค่าร้อยละของการยับยั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน

จากการทดลองพบว่าสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ไม่มีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 macrophage และไรทะเล จึงควรที่จะมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

Yelithao et al. (2019) ทำการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครงด้วยวิธี GC-MS พบว่า มีกลูโคสร้อยละ 75.5 และมีกาแลคโตสร้อยละ 7.60 ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง และการทดสอบของ Chen et al. (2020) ทำการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครงด้วยวิธี HPLC-UV พบว่า มีโมโนแซ็กคาไรด์หลักประกอบไปด้วย แมนโนส แรมโนส กรดกลูคูโรนิก กรดกาแลคทูโรนิก และกลูโคส ตามลำดับ การทดลองนี้ทำการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธี HPLC ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด พบว่าสารสกัดโพลีแซ็กคา

ไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด และเส้นใยในถุงเห็ด ประกอบไปด้วย น้ำตาลกาแลคโตส ปริมาณ 0.530±0.028 0.540±0.220 และ 0.361±0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม คิดเป็นร้อยละ 0.53 0.54 และ 0.36 ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ ตามลำดับ ขณะที่ขี้เลื่อยถุงเห็ดไม่พบน้ำตาลชนิดใดเลย จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลูโคสลดลงจากการสูญเสียโพลีแซ็กคาไรด์ไปกลับกระบวนการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะเซติก (Li et al., 2019)

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

1. จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) พบว่า มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยอยู่ที่ 33.093±4.238 กรัมต่อลิตร

2. จากการเพาะเห็ดแครงในขี้เลื่อยไม้ยางพาราเป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่า มีค่าร้อยละประสิทธิภาพทางชีวภาพเท่ากับ 2.33±0.12

3. จากการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดพบว่า มีปริมาณผลผลิตร้อยละ 1.30±0.06 และจากการหาองค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 0.635± 0.146 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.577±0.091 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 0.191± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.004±0.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.050±0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด

4. จากการสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด พบว่า มีปริมาณผลผลิตร้อยละ 1.11±0.31 และจากการหาองค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 0.741± 0.059 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.282±0.054 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 0.181± 0.003 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.006±0.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.051±0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด ตามลำดับ

5. การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด พบว่า มีปริมาณผลผลิตร้อยละ 0.21±0.11 และจากการหาองค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 0.666± 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.843±0.646 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยใน

ถุงเห็ด ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 0.229± 0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.003±0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.045±0.022 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด ตามลำดับ

6. การสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด พบว่า มีปริมาณผลผลิตร้อยละ 0.25±0.06 และจากการหาองค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 0.790± 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.266±0.020 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 0.249± 0.014 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.017±0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.050±0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด ตามลำดับ

7. จากการศึกษาผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกพบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากเส้นใยเห็ดและเส้นใยในถุงเห็ด สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

8. จากการศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ไม่สามารถส่งเสริมความสามารถของ *L. plantarum* MD-5 *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR2365 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

9. จากการศึกษาสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกส์ต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง พบว่า L. acidophilus สายพันธุ์ TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดสามารถทนต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

10. จากการศึกษาผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก การยับยั้งเชื้อก่อโรค และความทนทานของโพรไบโอติกส์ต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง สรุปได้ว่า โพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีคุณบัติความเป็นพรีไบโอติก

11. จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS คิดเป็นร้อยละ 20-40 และ 2-7 ของ Trolox ตามลำดับ

12. จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ RAW 264.7 macrophage ด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ดที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากเส้นใยในถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 0-125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากขี้เลื่อยถุงเห็ดที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ

13. จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ต่อไรทะเล พบว่า สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อไรทะเล

14. จากการวิเคราะห์หาโมโนแซ็กคาไรด์ ด้วย HPLC ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด พบว่าสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด และเส้นใยในถุงเห็ด ประกอบไปด้วย น้ำตาลกาแลคโตส ปริมาณ 0.530±0.028 0.540±0.220 และ 0.361±0.044 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ขณะที่ขี้เลื่อยถุงเห็ดไม่พบน้ำตาลชนิดใดเลย

รายการอ้างอิง

Acharya, K., Ghosh, S., Dutta, A.K., 2016. Pharmacognostic standardization based on physicochemical and molecular parameters of a medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine 16, 259-266.

Aida, F.M.N.A., Shuhaimi, M., Yazid, M., Maaruf, A.G., 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends in Food Science & Technology 20, 567-575.

Albalasmeh, A.A., Berhe, A.A., Ghezzehei, T.A., 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydrate polymers 97, 253-261.

Arome, D., Chinedu, E., 2013. The importance of toxicity testing. Journal of Pharmaceutical and BioSciences 4, 146-148.

Arunyik Mushroom Center, 2016. Mushroom cultivation steps.

Baran, K.P., 2014. Toxicity Testing, Dermal, in: Wexler, P. (Ed.), Encyclopedia of toxicology (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 652-655.

Blaiotta, G., La Gatta, B., Di Capua, M., Di Luccia, A., Coppola, R., Aponte, M., 2013. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. Food Microbiology 36, 161-169.

Blanco, A., Blanco, G., 2017. Carbohydrates, in: Blanco, A., Blanco, G. (Eds.), Medical biochemistry. Academic Press, Cambridge, pp. 73-97.

Butkhup, L., Samappito, W., Jorjong, S., 2018. Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. Food Science and Biotechnology 27, 193-202.

Chaikliang, C., Wichienchot, S., Youravong, W., Graidist, P., 2015. Evaluation on prebiotic properties of β-glucan and oligo-β-glucan from mushrooms by human fecal microbiota in fecal batch culture. Functional Foods in Health & Disease 5, 395-405.

Chen, Z., Yin, C., Fan, X., Ma, K., Yao, F., Zhou, R., Shi, D., Cheng, W., Gao, H., 2020. Characterization of physicochemical and biological properties of *Schizophyllum commune* polysaccharide extracted with different methods. International Journal of Biological Macromolecules 156, 1425-1434.

Cheung, P.C.K., 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. Nutrition Bulletin 35, 292-299.

Chonan, O., Takahashi, R., Watanuki, M., 2001. Role of activity of gastrointestinal microflora in absorption of calcium and magnesium in rats fed β1-4 linked galactooligosaccharides. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 65, 1872-1875.

Chou, W.T., Sheih, I.C., Fang, T.J., 2013. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. Journal of Food Science 78, 1041-1048.

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S.J., Berenjian, A., Ghasemi, Y., 2019. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. Foods 8, 92.

De La Rosa, L.A., Moreno Escamilla, J.O., Rodrigo García, J., Alvarez Parrilla, E., 2019. Phenolic compounds, in: Yahia, E.M. (Ed.), Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 253-271.

Ekowati, N., Mumpuni, A., Ratnaningtyas, N.I., Maharning, A.R., 2020. Compounds detection and inhibition activity of chloroform and ethyl acetate extracts of *Schizophyllum commune* on some cancer cell types. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 21, 5865-5871.

Gan, R.Y., Chan, C.L., Yang, Q.Q., Li, H.B., Zhang, D., Ge, Y.Y., Gunaratne, A., Ge, J., Corke, H., 2019. Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains, in: Feng, H., Nemzer, B., DeVries, J.W. (Eds.), Sprouted Grains. AACC International Press, Cambridge, pp. 191-246.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition 125, 1401-1412.

Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir Wijnkoop, I., Walker, C., Buddington, R., 2010. Dietary prebiotics: Current status and new definition. Food Science & Technology Bulletin Functional Foods 7, 1-19.

Guo, F., Williams, B., Kwakkel, R., Verstegen, M., 2003. *In vitro* fermentation characteristics of two mushroom species, an herb, and their polysaccharide fractions, using chicken cecal contents as inoculum. Poultry Science 82, 1608-1615.

Haurowitz, F., Koshland, D.E., 2020. Protein

Hobbs, C., 2005. The chemistry, nutritional value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill Fugus *Schizophyllum commune* Fr.(Schizophyllaceae). A literature review. International Journal of Medicinal Mushrooms 7, 127-140.

Hulla, J.E., Navarro, L., Kruger, C.L., Hayes, A.W., 2014. Toxicity, subchronic and chronic, in: Wexler, P. (Ed.), Encyclopedia of Toxicology (Third Edition). Academic Press, Oxford, pp. 626-633.

Imaizumi, K., Nakatsu, Y., Sato, M., Sedarnawati, Y., Sugano, M., 1991. Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty acids in diabetic rats. Agricultural and Biological Chemistry 55, 199-205.

Ito, M., Deguchi, Y., Miyamori, A., Matsumoto, K., Kikuchi, H., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Yajima, T., Kan, T., 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. Microbial Ecology in Health and Disease 3, 285-292.

Jain, A., Jain, R., Jain, S., 2020. Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology. Springer, New York.

Jamialahmadi, K., 2019. Beneficial applications of glucosamine, in: Patel, V.B. (Ed.), Molecular Nutrition: carbohydrates. Academic Press, Oxford, pp. 319-336.

Katano, H., Takakuwa, M., Hayakawa, H., Kimoto, H., 2016. Determination of chitin based on the colorimetric assay of glucosamine in acidic hydrolysate. Analytical Sciences 32, 701-703.

Kizilcik, M., Yamaç, M., 2010. Medium selection for exopolysaccharide and biomass production in submerged cultures of culinary-medicinal mushrooms from Turkey. 12, 63-71.

Koontz, L., 2014. TCA precipitation, in: Lorsch, J. (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, Oxford, pp. 3-10.

Kruger, N.J., 2009. The Bradford method for protein quantitation, in: Walker, J.M. (Ed.), The Protein Protocols Handbook. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17-24.

Kuete, V., Karaosmanoglu, O., Sivas, H., 2017. Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables, in: Kuete, V. (Ed.), Medicinal Spices and Vegetables from Africa. Academic Press, Oxford, pp. 271-297.

Kusrinah, K., Kasiamdari, R.S., 2017. Morphological characteristics and kinship relationship of mushroom *Schizophyllum commune* Fr. 2017 1, 7.

Li, Y., Shi, S., Yang, X., Zhou, H., 2019. The deproteinization, antioxidant acticities and inhibitory effect on &alpha -amylase of polysaccharides from corn silk. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 15, 83-90.

Lim, Y.Z., Hussain, S.M., Cicuttini, F.M., Wang, Y., 2019. Nutrients and dietary supplements for Osteoarthritis, in: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 97-137.

Lizcano, S.C., Dávila, J.A., Hernández, V., 2019. Fruit agroindustrial wastes for preparing beverages for medicinal purposes by supercritical fluid extraction technology: Andes berry (*Rubus glaucus benth*) case, in: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), Production and Management of Beverages. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 151-177.

McBain, A.J., Macfarlane, G.T., 2001. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. Journal of Medical Microbiology 50, 833-842.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. Analytical Chemistry 31, 426-428.

Mohammed, A.S.A., Naveed, M., Jost, N., 2021. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). Journal of Polymers and the Environment 29, 2359-2371.

Narkprasom, N., Huang, T., Guu, Y., 2012. Quantitative effects of oxygen supply on mycelia growth and extracellular polysaccharide of *Ganoderma tsugae*. Applied Mechanics and Materials 217-219, 975-978.

Nielsen, S.S., 2010. Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates, in: Nielsen, S.S. (Ed.), Food Analysis Laboratory Manual. Springer US, Boston, MA, pp. 47-53.

Nieuwenhuis, B.P.S., Aanen, D.K., 2018. Nuclear arms races: experimental evolution for mating success in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune*. PLOS ONE 13, e0209671.

Padhiar, A., Kumar, N.P., Albert, S., Arya, A., 2009. Morphology, anatomy and cultural characters of two wood decaying fungi *Schizophyllum commune* and *Flavadon flavus*. Journal of Mycology and Plant Pathology 39, 27-31.

Papich, M.G., 2016. Glucosamine chondroitin sulfate, in: Papich, M.G. (Ed.), Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition). W.B. Saunders, St. Louis, pp. 357-358.

Roberfroid, M., 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. Digestive and Liver Disease 34, 105-110.

Saranraj, P., Behera, S.S., Ray, R.C., 2019. Traditional foods from tropical root and tuber crops: Innovations and challenges, in: Galanakis, C.M. (Ed.), Innovations in Traditional Foods. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 159-191.

Satitsri, S., Muanprasat, C., 2020. Chitin and chitosan derivatives as biomaterial resources for biological and biomedical applications. Molecules 25, 5961.

Sawangwan, T., Wansanit, W., Pattani, L., Noysang, C., 2018. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. Agriculture and Natural Resources 52, 519-524.

Shaari, M.Y., Shuhaimi, M., Ariff, A., Bakar, F., Abdul Khalil, K., Othaman, M., Abd Manap, Y., 2012. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the growth of *Bifidobacterium* spp. as assessed using real-time PCR. International Food Research Journal 19, 1199-1205.

Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H., 1977. Chemical analysis of the hyphal walls of *Schizophyllum commune*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 496, 225-239.

Taechowisan, T., Samsawat, T., Puckdee, W., Phutdhawong, W.S., 2020. Cytotoxicity activity of geldanamycin derivatives against various cancer cell lines. Journal of Applied Pharmaceutical Science 10, 012-021.

Thetsrimuang, C., Khammuang, S., Sarnthima, R., 2011. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus sp*. strain RJ-2. International Journal of Pharmacology 7, 58-65.

Vandivort, T.C., Eaton, D.L., 2014. Principles of toxicology, Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier, Amsterdam.

Wakawa, H.Y., Fasihuddin, B.A., 2017. Brine shrimp lethality bioassay of *Abrus Precatorius* (LINN) leaves and root extract International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 9, 179-181.

Wong, F.C., Chai, T.T., Tan, S.L., Yong, A.L., 2013. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in Malaysia. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 12, 1011-1016.

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. Food Frontiers 1, 60-69.

Yelithao, K., Surayot, U., Lee, C., Palanisamy, S., Prabhu, N.M., Lee, J., You, S., 2019. Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomannans from Schizophyllum commune. Carbohydrate Polymers 218, 37-45.

Zhang, P., Sutheerawattananonda, M., 2020. Kinetic models for glucosamine production by acid hydrolysis of chitin in five mushrooms. International Journal of Chemical Engineering 2020, e5084036.

Zhu, F., Du, B., Xu, B., 2014. Preparation and characterization of polysaccharides from mushrooms. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-16.

รัฐพล ศรประเสริฐ และสยาม อรุณศรีมรกต, 2014. การเพาะเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เสริมด้วยใบหญ้าแฝกลุ่ม (*Vetiveria zizanioides*) ในวัสดุ เพาะขี้เลื่อยไม้ยางพารา. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 6, 837-847.

สุชาดา มานอก และปวีนา ลิ้มเจริญ, 2015. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 15, 106-117.

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium)

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar (Himedia, India)	39	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารผง PDA ด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Mushroom Completed Medium (MCM)

Peptone (Himedia, India)	2	กรัม
Yeast extract (Himedia, India)	2	กรัม
Glucose (Deajung, Korea)	20	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Univar, Australia)	0.5	กรัม
KH_2PO_4 (Univar, Australia)	0.46	กรัม
K_2HPO_4 (Univar, Australia)	1	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

Proteose peptone (Himedia, India)	10.0	กรัม
Beef extract (Himedia, India)	10.0	กรัม
Yeast extract (Himedia, India)	5.0	กรัม

Dextrose (Deajung, Korea)	20.0	กรัม
Tween 80 (PanReac, Spain)	1.0	กรัม
Ammonium citrate dibasic	2.0	กรัม
Sodium acetate (QRec, Newzealand)	5.0	กรัม
Magnesium sulphate (Univar, Australia)	0.1	กรัม
Manganese sulphate (Rankem, India)	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate (Daejung, Korea)	2.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร และปรับ pH ให้เป็น 6.5±0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth (NB) (Himedia, India)	13	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารผง NB ด้วยน้ำกลั่น และรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient agar (NA)

Nutrient Broth (NB) (Himedia, India)	13	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัม

ละลายอาหารผง NB และAgar ด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. การเตรียมถุงเพาะเห็ด

ขี้เลื่อย	100	กิโลกรัม
รำข้าว	5	กิโลกรัม
ยิบซั่ม	2	กิโลกรัม
ปูนขาว	1	กิโลกรัม
ดีเกลือ	0.2	กิโลกรัม

โดยมีความชื้นร้อยละ 65 จากนั้นนำไปแบ่งใส่ถุงพลาสติกขนาด 6.5x12.5 นิ้ว ถุงละ 900 กรัม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco, USA)	2	กรัม
10% Fetal bovine serum (Gibco, USA)	1000	ไมโครลิตร
Penicillin (Applichem, Germany)	1000	ไมโครลิตร
Streptomycin (Biobasic, USA)	1000	ไมโครลิตร
Amphotericin B (Gibco, USA)	100	ไมโครลิตร

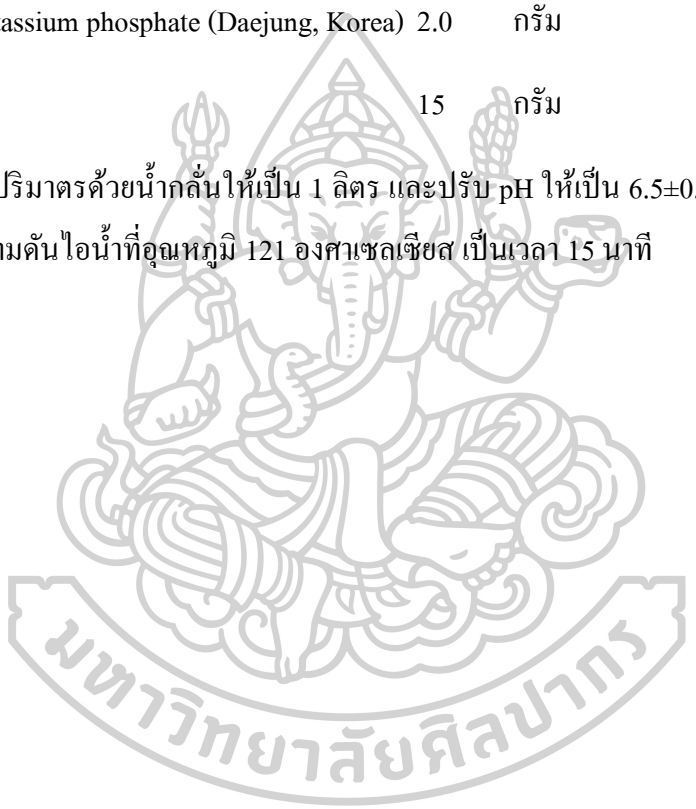
ละลายผง RPMI 1640 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และเติม 10% Fetal bovine serum, Penicillin กับ Streptomycin และปรับ pH ประมาณ 7.2-7.5 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar

Proteose peptone (Himedia, India)	10.0	กรัม
Beef extract (Himedia, India)	10.0	กรัม
Yeast extract (Himedia, India)	5.0	กรัม
Dextrose (Deajung, Korea)	20.0	กรัม

Tween 80 (PanReac,Spain)	1.0	กรัม
Ammonium citrate dibasic	2.0	กรัม
Sodium acetate (QRec, Newzealand)	5.0	กรัม
Magnesium sulphate (Univar, Australia)	0.1	กรัม
Manganese sulphate (Rankem, India)	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate (Daejung, Korea)	2.0	กรัม
Agar	15	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร และปรับ pH ให้เป็น 6.5±0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ภาคผนวก ข

การเตรียม reagent

1. ไฮโดรเจนคลอไรด์ (HCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์

conc. HCl (PanReac, Spain)	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 5 โมลาร์

NaOH (Fisher chemical, UK)	20	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Mo (VI)

Na2SiO3 (PanReac, Spain)	6.14	กรัมต่อลิตร
Na2MoO4 (Fluka, Switzerland)	123.55	กรัมต่อลิตร
CH3COOH	90.08	กรัมต่อลิตร
Dimethyl sulfoxide	300	มิลลิลิตรต่อลิตร

4. กรดไตรคลอโรอะเซติก (Trichloroacetic Acid; TCA) เข้มข้น 0.8 โมลาร์

Trichloroacetic Acid (Fisher Chemical, Belgium)	130.704	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

5. Dinitrosalicylic acid reagent (DNSA)

Dinitrosalicylic acid (Sigma-aldrich, India)	5	กรัม
2M NaOH (Fisher chemical, UK)	100	มิลลิลิตร
KNaC4H4O6.4H2O (QRec, Newzealand)	150	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

6. Bradford reagent

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka, Switzerland)	100	มิลลิกรัม
เอธานอล ความเข้มข้น 95%	50	มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85% (Univar, Australia)	100	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) ให้เป็น 1 ลิตร

7. Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10%

Folin-Ciocalteu (Loba chemie, India)	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

8. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 700 มิลลิโมลาร์

Na_2CO_3 (Himedia, India)	7.42	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

9. น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อเข้มข้น 0.5%

NaCl (QRec, Newzealand)	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. น้ำย่อยเทียม (gastric juices)

เป็ปซิน (Sigma	3	กรัมต่อลิตร

ละลายด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.5% ปรับ pH ให้เท่ากับ 2.00 ด้วย HCl โดยใช้พีเอชมิเตอร์วัดค่า

11. น้ำดีเทียม (bile juices)

Pancreatin	1	กรัมต่อลิตร

ละลายด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.5% โดยเกลือน้ำดี (bile salts) มีความเข้มข้นสุดท้าย 4.5% ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.00 ด้วยการเติม NaOH ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรที่ปราศจากเชื้อโดยใช้พีเอชมิเตอร์วัดค่า

12. Phosphat Buffer Saline (PBS)(10x)

NaCl (QRec, Newzealand)	80.0	กรัม
KCl (Chemex, USA)	2.0	กรัม
Na2HPO4•7H2O (Deajung, Korea)	11.45	กรัม
KH2PO4 (Univar, Australia)	2.4	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. 5- (4, 5-Dimethylthiazol 2-yl)-2, 5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT 5 มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) ให้เป็น 1 มิลลิลิตร

14. น้ำทะเลเทียม

NaCl (QRec, Newzealand) 26.29 กรัม

KCl (Chemex, USA) 0.74 กรัม

CaCl2 (Deajung, Korea) 0.99 กรัม

MgCl2•6H2O (Fluka, Switzweland) 6.09 กรัม

MgSO4•7H2O (Univar, Australia) 3.94 กรัม

นำมาละลายในน้ำที่ปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร และกรองโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 ปรับให้สารละลายมี pH เท่ากับ 7.8 และนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นแวลา 1 สัปดาห์

15. DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine) ความเข้มข้น 0.2 mM

สาร DPPH (Sigma-aldrich, Germany) 0.0788 มิลลิกรัม

ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

16. ABTS ความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์

ABTS (Sigma-aldrich, china) 3.84 กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

17. Acetate buffer pH 3.6 ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

Sodium acetate (QRec, Newzealand) 24.61 กรัม

Acetic acid 0.0452 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 3.6 ด้วย HCl และนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

18. Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Trolox (Sigma-aldrich, Switzerland) 5 มิลลิกรัม

ละลายด้วยเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ค

ปริมาณผลผลิตของเส้นในเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) และดอกเห็ดแครง

ตารางที่ 12 ปริมาณผลผลิตของเส้นในเห็ดที่เลี้ยงในอาหาร Mushroom Completed Medium (MCM) และดอกเห็ดแครง

ตัวอย่าง	Substrate	ปริมาณผลผลิต น้ำหนักสด (กรัม)	ปริมาณผลผลิต น้ำหนักแห้ง (กรัม)
ดอกเห็ด	500 g	11.711	4.894
ดอกเห็ด	500 g	11.004	3.633
ดอกเห็ด	500 g	12.219	3.755
เส้นใยเห็ด	25 ml	14.547	0.887
เส้นใยเห็ด	25 ml	11.187	0.705
เส้นใยเห็ด	25 ml	14.477	0.890

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ง

ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์

ตารางที่ 13 ปริมาณร้อยละผลผลิตของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตัวอย่าง	ซ้ำ	ปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)	ปริมาณสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ (กรัม)	yield (ร้อยละ)
ดอกเห็ด	1	20.00	0.255	1.275
	2	20.00	0.272	1.360
	3	20.00	0.250	1.250
เส้นใยเห็ด	1	20.00	0.213	1.065
	2	20.00	0.286	1.430
	3	20.00	0.164	0.820
เส้นใยในถุงเห็ด	1	20.00	0.020	0.100
	2	20.00	0.043	0.215
	3	20.00	0.064	0.320
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	20.00	0.060	0.300
	2	20.00	0.036	0.180
	3	20.00	0.053	0.265

มหาวิทยาลัยศิลปากร

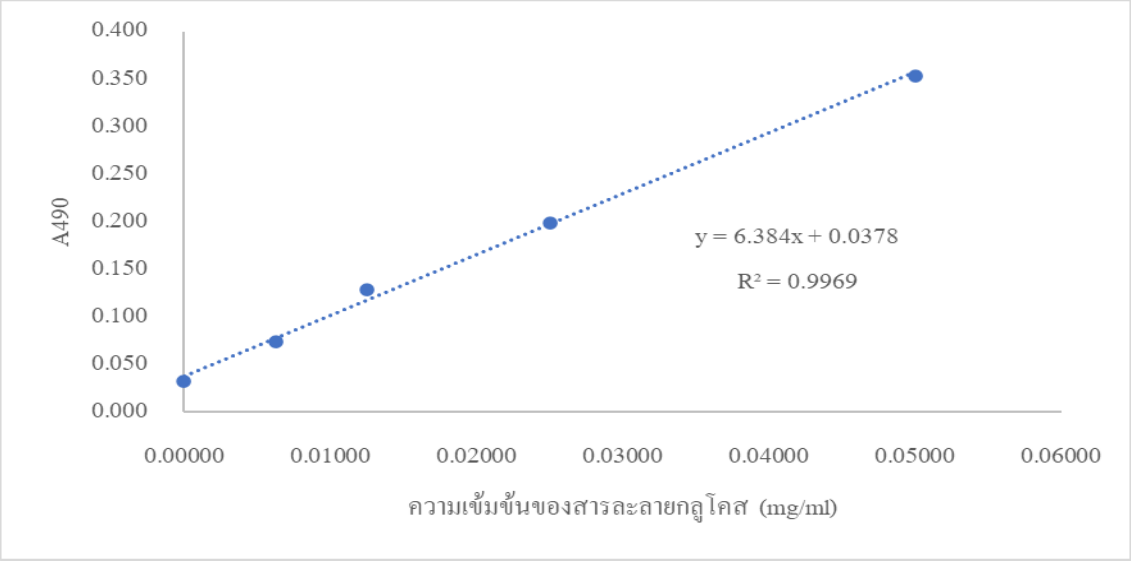
ภาคผนวก จ

การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

1. สารละลายมาตรฐานกลูโคส

ตารางที่ 14 การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid ของน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml)	A490
0.05000	0.354
0.02500	0.199
0.01250	0.129
0.00625	0.074
0.00000	0.032



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 0-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตารางที่ 15 การวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A490	ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (mg/mg of crude polysaccharide)
ดอกเห็ด	1	0.228	0.597
	2	0.292	0.795
	3	0.201	0.512
เส้นใยเห็ด	1	0.296	0.810
	2	0.264	0.707
	3	0.264	0.707
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.251	0.669
	2	0.268	0.721
	3	0.232	0.608
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.278	0.752
	2	0.296	0.807
	3	0.297	0.810

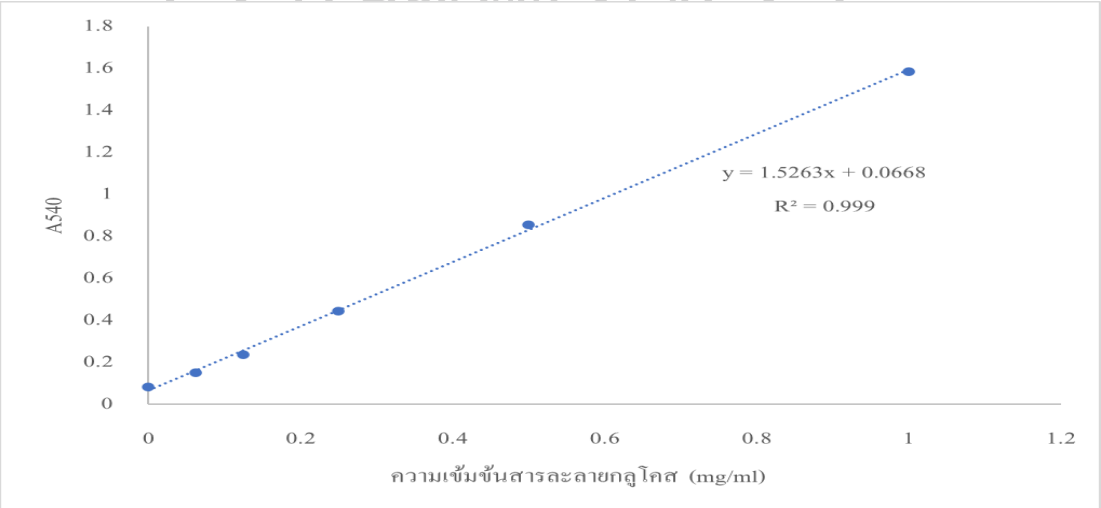
ภาคผนวก ฉ

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

1. สารละลายมาตรฐานกลูโคส

ตารางที่ 16 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) ของน้ำตาลกลูโคส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกลูโคส (mg/ml)	A540
1.0000	1.5838
0.5000	0.8567
0.2500	0.4453
0.1250	0.2364
0.0625	0.1522
0.0000	0.0838



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสของการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

2. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตารางที่ 17 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS)

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A540	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/mg of crude polysaccharide)
ดอกเห็ด	1	0.1099	0.565
	2	0.1009	0.447
	3	0.1060	0.514
เส้นใยเห็ด	1	0.0960	0.383
	2	0.0987	0.418
	3	0.1006	0.443
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.1002	0.438
	2	0.0998	0.432
	3	0.0998	0.432
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.1018	0.459
	2	0.0964	0.388
	3	0.0998	0.432

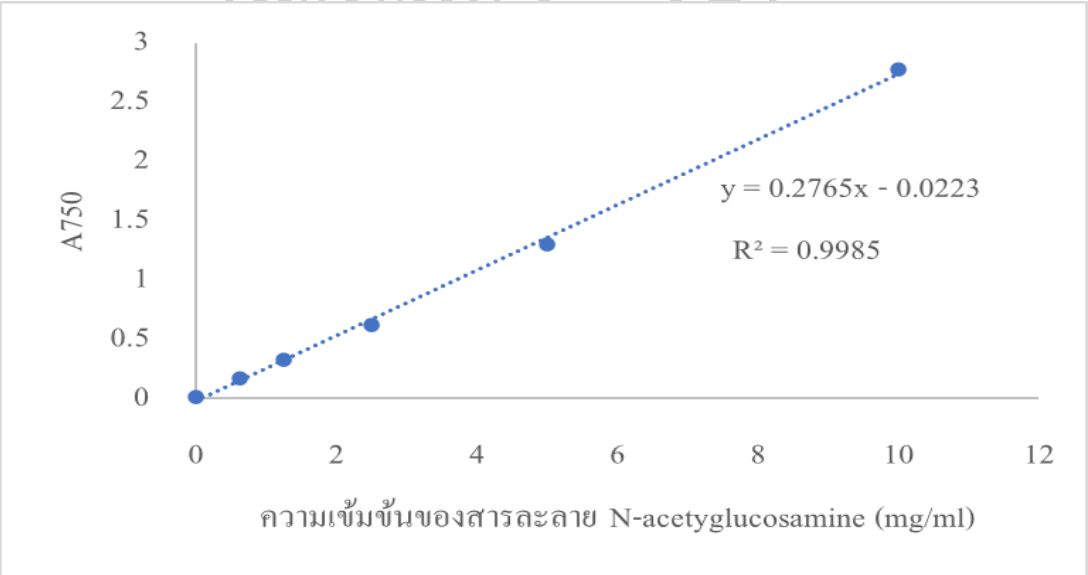
ภาคผนวก ช

การวัดปริมาณกลูโคซามีน

1. สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน

ตารางที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ของกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของกลูโคซามีน (mg/ml)	A750
10	2.779
5	1.306
2.5	0.624
1.25	0.3276
0.625	0.1674
0	0.0187



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคซามีน

2. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตารางที่ 19 ปริมาณกลูโคซามีนของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A750	ปริมาณกลูโคซามีน (mg/mg of crude polysaccharide)
ดอกเห็ด	1	0.5130	0.194
	2	0.5010	0.189
	3	0.5030	0.190
เส้นใยเห็ด	1	0.4740	0.179
	2	0.4870	0.184
	3	0.4700	0.178
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.5800	0.218
	2	0.6500	0.243
	3	0.6060	0.227
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.6220	0.233
	2	0.6970	0.260
	3	0.6780	0.253

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ซ

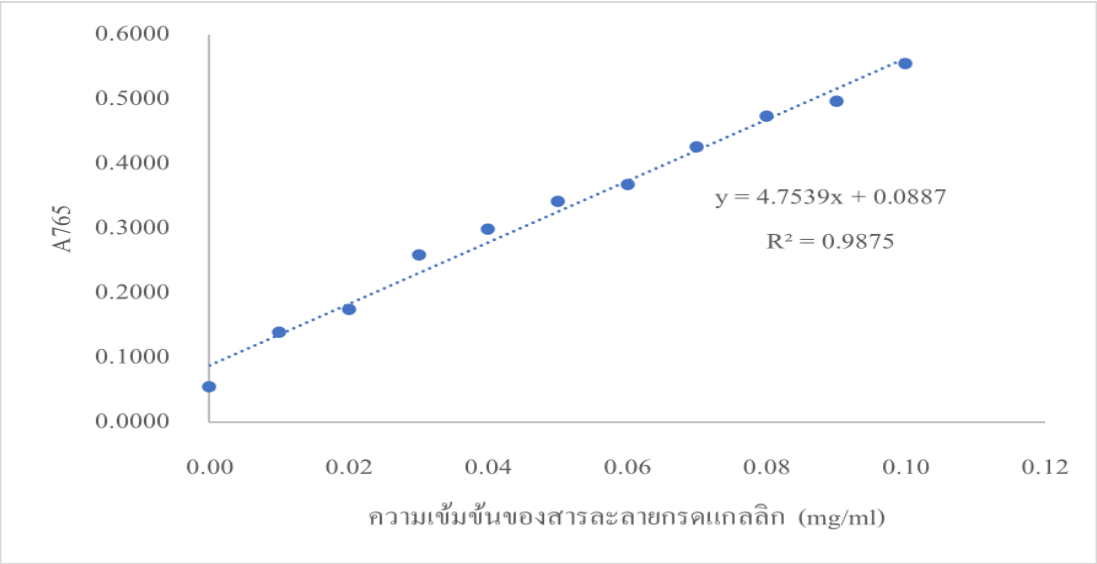
การวัดปริมาณฟีนอกลิกทั้งด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

1. วัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารมาตรฐานกรดแกลลิคด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

ตารางที่ 20 การวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ของกรดแกลลิค โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดแกลลิค (mg/ml)	A765
0.10	0.5550
0.09	0.4977
0.08	0.4738
0.07	0.4259
0.06	0.3678
0.05	0.3422
0.04	0.2987
0.03	0.2597
0.02	0.1744
0.01	0.1393
0.00	0.0558

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคของการวัดปริมาณฟินอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตารางที่ 21 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A765	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg/mg of crude polysaccharide)
ดอกเห็ด	1	0.3032	0.005
	2	0.2734	0.004
	3	0.2714	0.004
เส้นใยเห็ด	1	0.3192	0.005
	2	0.3471	0.006
	3	0.3220	0.005
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.2545	0.004
	2	0.2025	0.003
	3	0.2030	0.003
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.1814	0.002
	2	0.0955	0.000
	3	0.1744	0.002

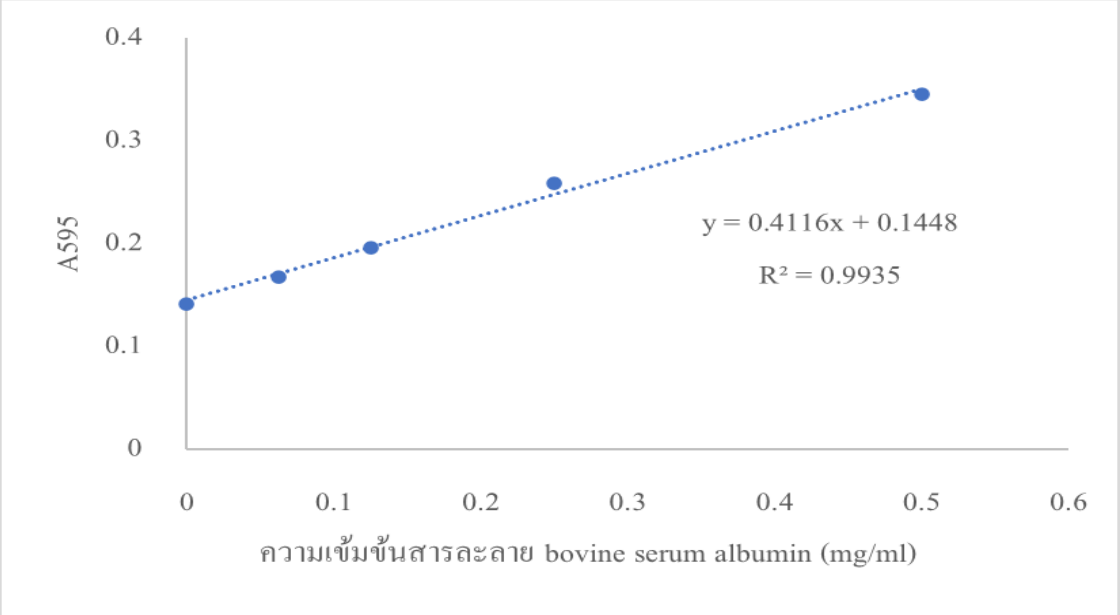
ภาคผนวก ด

การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford

1. สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ตารางที่ 22 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดของสารมาตรฐาน ด้วยวิธี Bradford ของ bovine serum albumin (BSA) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของ bovine serum albumin (BSA) (mg/ml)	A595
0.5	0.3453
0.25	0.259
0.125	0.1962
0.0625	0.1675
0	0.1418



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ของการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Bradford

2. สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด

ตารางที่ 23 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วัดด้วยวิธี Bradford

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A595	ปริมาณโปรตีน (mg/mg of crude polysaccharide)
ดอกเห็ด	1	0.1649	0.049
	2	0.1709	0.063
	3	0.1602	0.037
เส้นใยเห็ด	1	0.1601	0.037
	2	0.1660	0.052
	3	0.1717	0.065
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.1731	0.069
	2	0.1614	0.040
	3	0.1552	0.025
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.1505	0.014
	2	0.1494	0.011
	3	0.1551	0.025

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ต

ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก

ตารางที่ 24 ค่า OD620 ของ *L. plantarum* MD-5, *L. plantarum* MD-11 และ *L. acidophilus* TISTR2365 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด รวมถึงอินูลิน

ตัวอย่าง	OD620								
	L. plantarum MD-5			*L. plantarum* MD-11			*L. acidophilus* TISTR2365		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
MRS	1.206	1.194	1.205	1.245	1.257	1.244	0.371	0.404	0.290
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1.306	1.245	1.273	1.361	1.364	1.364	0.450	0.469	0.465
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	1.157	1.236	1.262	1.084	1.080	1.094	0.189	0.209	0.212
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	1.271	1.332	1.317	1.101	1.102	1.111	0.559	0.575	0.482
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1.175	1.144	1.152	0.889	0.889	0.889	0.640	0.720	0.559
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1.187	1.124	1.177	1.208	1.203	1.222	0.054	0.055	0.052

ภาคผนวก ฉ

ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

ตารางที่ 25 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-5 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร		เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
		B. cereus TISTR687	*E. coli* TISTR887	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR885
MRS	**1**	0.7	0.0	0.4	0.0
	2	0.7	0.0	0.5	0.0
	3	0.7	0.0	0.5	0.0
MRS+ 10 mg/ml Inulin	**1**	0.7	0.0	0.6	0.0
จาก Chicory	**2**	1.0	0.0	0.4	0.0
	3	1.0	0.0	0.5	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.6	0.0	0.4	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.7	0.0	0.2	0.0
จากดอกเห็ด	**3**	0.7	0.0	0.4	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.8	0.0	0.3	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.8	0.0	0.4	0.0
จากเส้นใยเห็ด	**3**	0.8	0.0	0.3	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.8	0.0	0.4	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.8	0.0	0.4	0.0
จากเส้นใยในถุงเห็ด	**3**	0.7	0.0	0.4	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.6	0.0	0.3	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.7	0.0	0.4	0.0
จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	**3**	0.8	0.0	0.3	0.0

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 26 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. plantarum* MD-11 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร		เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
		B. cereus TISTR687	*E. coli* TISTR887	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR885
MRS	**1**	0.8	0.0	0.3	0.0
	2	0.7	0.0	0.3	0.0
	3	0.7	0.0	0.4	0.0
MRS+ 10 mg/ml Inulin	**1**	1.0	0.0	0.3	0.0
จาก Chicory	**2**	0.9	0.0	0.3	0.0
	3	0.9	0.0	0.3	0.0
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**1**	0.6	0.0	0.0	0.0
จากดอกเห็ด	**2**	0.7	0.0	0.0	0.0
	3	0.6	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.8	0.0	0.3	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.7	0.0	0.2	0.0
จากเส้นใยเห็ด	**3**	0.8	0.0	0.3	0.0
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**1**	0.7	0.0	0.2	0.0
จากเส้นใยในถุงเห็ด	**2**	0.7	0.0	0.3	0.0
	3	0.7	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**1**	0.5	0.0	0.2	0.0
จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	**2**	0.6	0.0	0.2	0.0
	3	0.7	0.0	0.1	0.0

ตารางที่ 27 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* TISTR687 *E. coli* TISTR887 *S. typhimurium* TISTR292 และ *S. aureus* TISTR885 ของอาหารที่เติมสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด ขี้เลื่อยถุงเห็ด และอินูลินที่ผ่านการเลี้ยง *L. acidophilus* TISTR2365 มา 48 ชั่วโมง

อาหาร		เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)			
		B. cereus TISTR687	*E. coli* TISTR887	*S. typhimurium* TISTR292	*S. aureus* TISTR885
MRS	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	0.0	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml Inulin	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
จาก Chicory	**2**	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	0.0	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.0	0.0	0.0	0.0
จากดอกเห็ด	**3**	0.0	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.0	0.0	0.0	0.0
จากเส้นใยเห็ด	**3**	0.3	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.0	0.0	0.0	0.0
จากเส้นใยในถุงเห็ด	**3**	0.0	0.0	0.0	0.0
MRS+ 10 mg/ml	**1**	0.0	0.0	0.0	0.0
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	**2**	0.0	0.0	0.0	0.0
จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	**3**	0.0	0.0	0.0	0.0

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ท

ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อความทนทานของโพรไบโอติกส์ต่อสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง

ตารางที่ 28 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* MD-5 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)											
		0 (นาที)		15 (นาที)		30 (นาที)		60 (นาที)		90 (นาที)		180 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	1.38E+09	1.40E+09	9.00E+08	1.04E+09	1.48E+08	1.46E+08	1.22E+04	1.36E+04	1.62E+03	1.48E+03	4.00E+01	2.40E+02
	2	4.58E+09	4.48E+09	6.40E+08	7.40E+08	4.56E+07	4.24E+07	8.20E+03	1.00E+04	1.40E+02	1.60E+02	1.20E+02	1.00E+02
	3	1.58E+09	1.44E+09	5.00E+08	7.40E+08	8.00E+07	8.20E+07	6.60E+03	9.20E+03	4.60E+02	3.40E+02	8.00E+01	2.40E+02
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1	6.40E+09	5.00E+09	8.00E+08	7.40E+08	4.20E+06	4.40E+06	1.80E+04	1.76E+04	1.62E+03	1.58E+03	2.00E+02	2.20E+02
	2	5.20E+09	6.60E+09	7.00E+08	8.20E+08	5.00E+06	4.60E+06	1.74E+04	1.82E+04	1.68E+03	1.72E+03	2.40E+02	2.40E+02
	3	6.00E+09	6.00E+09	7.80E+08	8.40E+08	6.00E+06	4.80E+06	1.68E+04	1.66E+04	1.76E+03	1.76E+03	3.00E+02	2.00E+02
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	1	2.02E+09	2.10E+09	5.80E+08	4.00E+08	1.50E+06	1.38E+06	2.00E+01	2.00E+01	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	2	2.60E+09	2.40E+09	4.60E+08	6.00E+08	2.00E+04	2.00E+04	3.40E+02	2.00E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	3	2.60E+09	2.60E+09	9.00E+08	1.04E+09	1.06E+06	9.20E+05	5.00E+02	5.20E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	1	4.60E+09	4.20E+09	4.16E+08	4.70E+08	9.60E+07	8.60E+07	1.02E+03	9.80E+02	2.00E+02	6.00E+01	1.20E+02	2.00E+02
	2	5.28E+09	5.72E+09	1.18E+09	1.28E+09	1.54E+08	1.36E+08	2.20E+05	2.16E+05	1.80E+02	2.80E+02	2.00E+01	4.00E+01
	3	9.22E+09	8.66E+09	9.40E+08	9.20E+08	7.20E+07	9.40E+07	3.00E+03	2.60E+03	2.60E+02	3.80E+02	2.00E+01	6.00E+01
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1	7.40E+08	9.20E+08	1.00E+09	9.00E+08	1.34E+08	1.32E+08	5.22E+05	4.84E+05	1.22E+05	1.30E+05	1.20E+02	2.40E+02
	2	1.02E+09	1.14E+09	8.60E+08	1.00E+09	5.16E+07	5.28E+07	1.42E+04	1.30E+04	6.00E+03	7.40E+03	4.00E+01	8.00E+01
	3	9.60E+08	8.60E+08	8.00E+08	1.00E+09	1.28E+08	1.38E+08	5.02E+05	5.24E+05	7.00E+03	9.20E+03	6.00E+01	1.40E+02
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	2.66E+09	1.78E+09	7.00E+07	7.20E+07	4.40E+05	3.40E+05	4.00E+03	6.00E+03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	2	1.22E+09	7.20E+08	6.20E+08	6.00E+08	1.48E+06	1.52E+06	7.60E+03	6.00E+03	4.00E+01	1.60E+02	2.00E+01	8.00E+01
	3	1.54E+09	1.58E+09	2.62E+08	3.08E+08	1.78E+06	2.30E+06	4.00E+03	3.80E+03	1.40E+02	1.40E+02	0.00E+00	0.00E+00

ตารางที่ 29 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. plantarum* MD-11 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)											
		0 (นาที)		15 (นาที)		30 (นาที)		60 (นาที)		90 (นาที)		180 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	4.20E+10	4.02E+10	1.98E+09	2.04E+09	4.98E+08	5.04E+08	2.60E+04	3.00E+04	1.02E+04	1.10E+04	5.40E+02	4.40E+02
	2	4.02E+10	4.18E+10	2.06E+09	2.02E+09	5.00E+08	5.18E+08	2.40E+04	2.80E+04	1.08E+04	1.18E+04	4.60E+02	4.60E+02
	3	4.30E+10	4.20E+10	1.90E+09	2.06E+09	4.40E+08	4.28E+08	3.20E+04	2.60E+04	9.80E+03	1.10E+04	4.80E+02	5.00E+02
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1	4.80E+10	4.72E+10	4.00E+08	4.20E+08	9.20E+07	1.00E+08	1.36E+03	1.30E+03	4.40E+02	4.80E+02	2.40E+02	4.80E+02
	2	4.62E+10	4.44E+10	4.40E+08	3.80E+08	9.40E+07	1.18E+08	1.42E+03	1.26E+03	6.00E+02	4.80E+02	4.00E+02	4.20E+02
	3	4.76E+10	4.68E+10	5.00E+08	4.20E+08	9.60E+07	9.60E+07	1.38E+03	1.30E+03	4.20E+02	5.00E+02	4.40E+02	3.60E+02
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด	1	8.40E+09	7.80E+09	5.00E+08	7.20E+08	2.00E+06	2.20E+06	9.40E+03	7.80E+03	2.20E+03	2.04E+03	2.60E+02	2.80E+02
	2	8.60E+09	9.00E+09	6.60E+08	6.00E+08	2.40E+06	2.80E+06	9.20E+03	8.80E+03	2.60E+03	2.54E+03	2.80E+02	2.20E+02
	3	8.20E+09	7.40E+09	5.40E+08	6.40E+08	2.60E+06	2.20E+06	9.00E+03	9.00E+03	2.22E+03	2.50E+03	3.00E+02	2.80E+02
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด	1	3.24E+10	3.02E+10	4.00E+08	4.40E+08	5.40E+06	4.80E+06	2.50E+04	2.40E+04	9.00E+03	8.00E+03	1.20E+02	1.40E+02
	2	3.38E+10	2.88E+10	4.20E+08	4.20E+08	5.20E+06	5.00E+06	2.60E+04	2.58E+04	8.60E+03	1.00E+04	1.00E+02	1.00E+02
	3	3.08E+10	3.04E+10	3.80E+08	4.00E+08	5.40E+06	4.40E+06	2.44E+04	2.54E+04	8.40E+03	8.20E+03	1.20E+02	8.00E+01
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1	1.24E+10	1.18E+10	5.80E+07	6.00E+07	5.00E+06	5.20E+06	8.00E+02	9.80E+02	4.80E+02	5.00E+02	3.80E+02	3.60E+02
	2	1.18E+10	1.06E+10	4.20E+07	5.00E+07	4.40E+06	4.80E+06	8.20E+02	9.60E+02	5.00E+02	4.40E+02	3.40E+02	3.60E+02
	3	1.08E+10	1.12E+10	6.20E+07	5.20E+07	4.60E+06	5.20E+06	7.80E+02	8.80E+02	4.40E+02	4.40E+02	2.20E+02	3.20E+02
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	4.60E+10	4.40E+10	4.00E+08	3.00E+08	4.00E+06	4.80E+06	2.20E+03	2.40E+03	4.00E+02	4.60E+02	6.00E+01	4.00E+01
	2	4.30E+10	4.32E+10	3.40E+08	3.00E+08	4.20E+06	4.60E+06	2.40E+03	2.60E+03	4.60E+02	3.80E+02	6.00E+01	4.00E+01
	3	4.48E+10	4.24E+10	3.60E+08	3.20E+08	4.80E+06	4.60E+06	2.40E+03	2.80E+03	4.20E+02	5.00E+02	2.00E+01	6.00E+01

ตารางที่ 30 ปริมาณจุลินทรีย์ *L. acidophilus* TISTR2365ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำย่อยเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)											
		0 (นาที)		15 (นาที)		30 (นาที)		60 (นาที)		90 (นาที)		180 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	8.00E+09	8.80E+09	7.80E+09	8.40E+09	3.00E+08	3.06E+08	1.42E+08	1.50E+08	7.20E+06	7.80E+06	1.86E+05	2.00E+05
	2	1.60E+09	1.62E+09	1.42E+09	1.46E+09	1.78E+08	1.64E+08	8.40E+07	7.80E+07	7.00E+06	6.20E+06	1.88E+05	1.92E+05
	3	7.80E+09	9.00E+09	4.00E+09	4.60E+09	2.82E+08	2.98E+08	1.50E+08	1.52E+08	6.20E+06	6.80E+06	2.00E+05	2.04E+05
MRS	1	1.20E+09	1.40E+09	2.00E+08	6.00E+08	1.00E+08	1.50E+08	4.00E+07	4.80E+07	1.80E+07	1.00E+07	2.00E+05	4.00E+05
+ 10 mg/ml Inulin	2	1.40E+09	1.40E+09	4.00E+08	8.00E+08	1.60E+08	1.20E+08	7.00E+07	5.00E+07	1.60E+07	1.60E+07	4.00E+05	6.00E+05
จาก Chicory	3	1.20E+09	1.00E+09	4.00E+08	4.00E+08	1.60E+08	1.40E+08	4.40E+07	5.80E+07	1.40E+07	1.80E+07	2.00E+05	2.00E+05
MRS+10 mg/ml	1	8.20E+08	9.00E+08	6.00E+08	5.60E+08	2.02E+07	1.80E+07	8.60E+06	7.80E+06	2.02E+05	1.82E+05	2.00E+03	4.00E+03
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	2	9.80E+08	8.20E+08	5.80E+08	5.40E+08	2.04E+07	1.90E+07	8.40E+06	7.00E+06	1.88E+05	1.74E+05	6.00E+03	4.20E+03
จากดอกเห็ด	3	7.60E+08	9.00E+08	5.60E+08	5.60E+08	1.80E+07	1.86E+07	9.00E+06	7.20E+06	1.82E+05	1.64E+05	4.40E+03	3.60E+03
MRS+ 10 mg/ml	1	2.40E+09	2.60E+09	1.00E+09	8.00E+08	1.44E+08	1.46E+08	1.48E+08	1.40E+08	8.00E+07	1.00E+08	4.00E+06	3.60E+06
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	2	2.20E+09	2.40E+09	8.00E+08	6.00E+08	1.43E+08	1.50E+08	1.42E+08	1.38E+08	8.20E+07	8.20E+07	4.20E+06	4.60E+06
จากเส้นใยเห็ด	3	2.20E+09	3.00E+09	1.00E+09	1.00E+09	1.36E+08	1.51E+08	1.46E+08	1.30E+08	9.20E+07	9.00E+07	3.80E+06	3.80E+06
MRS+ 10 mg/ml	1	1.64E+10	1.78E+10	1.42E+10	1.50E+10	2.58E+08	2.70E+08	1.18E+08	1.04E+08	3.42E+07	3.38E+07	2.10E+06	2.20E+06
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	2	1.76E+10	1.62E+10	1.44E+10	1.24E+10	2.62E+08	2.44E+08	1.20E+08	1.08E+08	3.22E+07	3.18E+07	2.02E+06	1.80E+06
จากเส้นใยในถุงเห็ด	3	1.22E+10	1.44E+10	1.30E+10	1.26E+10	2.44E+08	2.42E+08	1.02E+08	1.20E+08	3.34E+07	3.20E+07	2.08E+06	1.92E+06
MRS+ 10 mg/ml	1	2.00E+08	4.00E+08	3.00E+07	2.60E+07	2.00E+07	3.50E+07	6.00E+06	4.00E+06	2.60E+05	4.00E+05	1.16E+04	1.02E+04
สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	2	4.00E+08	6.00E+08	2.20E+07	2.80E+07	2.00E+07	4.00E+07	6.00E+06	2.00E+06	2.20E+05	3.00E+05	1.20E+04	1.10E+04
จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	3	2.00E+08	6.00E+08	3.00E+07	3.20E+07	2.00E+07	3.00E+07	2.00E+06	4.00E+06	2.80E+05	2.80E+05	1.34E+04	1.26E+04

ตารางที่ 31 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. plantarum* MD-5 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)			
		0 (นาที)		240 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	5.80E+09	7.80E+09	1.60E+09	1.80E+09
	2	1.04E+10	1.20E+10	2.40E+09	2.00E+09
	3	4.60E+09	5.60E+09	1.40E+09	6.00E+08
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1	7.00E+09	8.00E+09	6.40E+07	8.20E+07
	2	7.80E+09	7.20E+09	6.60E+07	7.00E+07
	3	8.40E+09	6.60E+09	7.00E+07	7.00E+07
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากดอกเห็ด	1	1.36E+10	1.52E+10	8.20E+09	6.00E+09
	2	3.60E+09	6.60E+09	2.80E+09	3.20E+09
	3	2.02E+10	1.96E+10	8.00E+09	8.00E+09
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากเส้นใยเห็ด	1	7.80E+09	9.80E+09	7.80E+08	8.00E+08
	2	4.00E+09	5.60E+09	1.50E+09	1.76E+09
	3	5.40E+09	6.20E+09	7.00E+08	1.06E+09
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1	1.30E+10	1.34E+10	3.80E+08	3.80E+08
	2	1.60E+10	1.38E+10	5.20E+08	4.80E+08
	3	1.78E+10	1.56E+10	5.20E+08	4.80E+08
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	4.20E+09	4.40E+09	1.00E+08	2.00E+08
	2	5.80E+09	7.00E+09	1.00E+08	2.00E+08
	3	5.00E+09	4.40E+09	1.80E+08	1.80E+08

ตารางที่ 32 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. plantarum* MD-11 ต่อผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)			
		0 (นาที)		240 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	6.60E+09	6.20E+09	5.94E+09	6.04E+09
	2	6.20E+09	8.00E+09	5.28E+09	5.18E+09
	3	7.00E+09	6.00E+09	5.20E+09	5.74E+09
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1	6.00E+09	5.40E+09	1.02E+09	1.14E+09
	2	6.00E+09	5.80E+09	1.04E+09	1.08E+09
	3	5.20E+09	4.80E+09	1.06E+09	1.08E+09
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากดอกเห็ด	1	1.08E+10	1.14E+10	1.74E+09	1.70E+09
	2	1.02E+10	1.04E+10	1.58E+09	1.64E+09
	3	9.80E+09	1.10E+10	1.30E+09	1.34E+09
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากเส้นใยเห็ด	1	1.04E+10	1.00E+10	1.38E+09	1.44E+09
	2	1.02E+10	1.06E+10	1.30E+09	1.24E+09
	3	1.08E+10	1.08E+10	1.26E+09	1.28E+09
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1	8.00E+09	1.00E+10	8.00E+08	6.00E+08
	2	8.20E+09	8.60E+09	7.80E+08	7.20E+08
	3	8.60E+09	9.80E+09	6.60E+08	6.80E+08
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	1.04E+10	1.08E+10	1.26E+09	1.14E+09
	2	1.00E+10	1.02E+10	1.20E+09	1.34E+09
	3	9.60E+09	9.00E+09	1.18E+09	1.28E+09

ตารางที่ 33 ปริมาณจุลลินทรีย์ *L. acidophilus* TISTR2365ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองโดยใช้น้ำดีเทียม

ตัวอย่าง		ปริมาณจุลลินทรีย์ (cfu/ml)			
		0 (นาที)		240 (นาที)	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
MRS	1	8.00E+09	8.20E+09	1.20E+08	1.22E+08
	2	8.60E+09	1.12E+10	1.02E+08	1.10E+08
	3	1.04E+10	9.80E+09	1.26E+08	1.20E+08
MRS+ 10 mg/ml Inulin จาก Chicory	1	1.40E+09	1.60E+09	8.00E+06	1.20E+07
	2	1.40E+09	1.40E+09	6.00E+06	1.20E+07
	3	8.00E+08	1.20E+09	4.00E+06	8.00E+06
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากดอกเห็ด	1	8.00E+08	1.00E+09	7.80E+05	6.20E+05
	2	1.00E+09	6.00E+08	8.80E+05	7.80E+05
	3	4.00E+08	1.00E+09	6.60E+05	6.80E+05
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากเส้นใยเห็ด	1	3.00E+09	2.80E+09	4.00E+07	4.20E+07
	2	2.60E+09	2.60E+09	4.40E+07	3.80E+07
	3	2.80E+09	3.20E+09	3.20E+07	3.80E+07
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด	1	1.40E+10	1.50E+10	1.50E+08	1.48E+08
	2	1.36E+10	1.32E+10	1.52E+08	1.42E+08
	3	1.42E+10	1.46E+10	1.40E+08	1.44E+08
MRS+ 10 mg/ml สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ จากขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	4.00E+08	6.00E+08	4.20E+05	5.00E+05
	2	6.00E+08	4.00E+08	4.00E+05	4.60E+05
	3	4.00E+08	4.00E+08	6.00E+05	5.00E+05

ภาคผนวก น

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

ตารางที่ 34 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี DPPH

ความเข้มข้นของ Trolox (mg/ml)	A520 (As)	A520 (Ab)	A520 (Ac)
0.250	0.0858	0.0363	0.2564
0.125	0.0874	0.0363	0.2564
0.063	0.1698	0.0363	0.2564
0.031	0.1955	0.0363	0.2564
0.000	0.2927	0.0363	0.2564

As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของ Blank (น้ำ)

Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 35 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A520 (As)	A520 (Ab)	A520 (Ac)
ดอกเห็ด	1	0.2843	0.0471	0.2564
	2	0.2297	0.0561	0.2564
	3	0.2508	0.0438	0.2564
เส้นใยเห็ด	1	0.2267	0.0455	0.2564
	2	0.2475	0.0660	0.2564
	3	0.2536	0.0601	0.2564
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.2297	0.0404	0.2564
	2	0.2107	0.0468	0.2564
	3	0.2161	0.0443	0.2564
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.2654	0.0504	0.2564
	2	0.2480	0.0405	0.2564
	3	0.2563	0.0429	0.2564

As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของ Blank (น้ำ)

Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก บ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นในในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

ตารางที่ 36 ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของ Trolox ด้วยวิธี ABTS

ความเข้มข้นของ Trolox (mg/ml)	A734 (As)	A734 (Ab)	A734 (Ac)
0.250	0.0409	0.0397	0.1770
0.125	0.0423	0.0397	0.1770
0.063	0.0412	0.0397	0.1770
0.031	0.0982	0.0397	0.1770
0.000	0.1492	0.0397	0.1770

As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของ Blank (น้ำ)

Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 37 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากจากดอกเห็ด เส้นใยเห็ด เส้นใยในถุงเห็ด และขี้เลื่อยถุงเห็ด ด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

สารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์	ซ้ำที่	A734 (As)	A734 (Ab)	A734 (Ac)
ดอกเห็ด	1	0.2069	0.0415	0.1819
	2	0.2098	0.0411	0.1819
	3	0.2138	0.0419	0.1819
เส้นใยเห็ด	1	0.2146	0.0402	0.1819
	2	0.2229	0.0410	0.1819
	3	0.2173	0.0417	0.1819
เส้นใยในถุงเห็ด	1	0.2164	0.0403	0.1819
	2	0.2147	0.0397	0.1819
	3	0.2178	0.0405	0.1819
ขี้เลื่อยถุงเห็ด	1	0.2169	0.0399	0.1819
	2	0.2125	0.0398	0.1819
	3	0.2130	0.0424	0.1819

As หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของตัวอย่าง

Ab หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของ Blank (น้ำ)

Ac หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ของชุดควบคุม

ภาคผนวก ป

ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ตารางที่ 38 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ความเข้มข้นของสารสกัด	OD570			ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
(µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	0.2041	0.2239	0.1840	68.79	75.46	62.02
500	0.2149	0.1852	0.2111	72.43	62.42	71.15
250	0.1739	0.2068	0.1926	58.61	69.70	64.91
125	0.2072	0.3022	0.2767	69.83	101.85	93.26
62	0.3361	0.2928	0.2550	113.28	98.69	85.95
31	0.3297	0.2930	0.3056	111.12	98.75	103.00
15	0.4054	0.4560	0.4586	136.64	153.69	154.57
0	0.3032	0.3089	0.2780	102.19	104.11	93.70

ตารางที่ 39 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ความเข้มข้นของสารสกัด	OD570			ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
(µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	0.1807	0.1514	0.1669	60.90	51.03	56.25
500	0.1756	0.2438	0.2217	59.18	82.17	74.72
250	0.2108	0.1740	0.1856	71.05	58.65	62.55
125	0.2410	0.2025	0.2794	81.23	68.25	94.17
62	0.2755	0.2537	0.3146	92.85	85.51	106.03
31	0.2727	0.3064	0.2891	91.91	103.27	97.44
15	0.5125	0.4647	0.4894	172.73	156.62	164.95
0	0.3032	0.3089	0.2780	102.19	104.11	93.70

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 40 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ความเข้มข้นของสารสกัด	OD570			ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
(µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	0.0967	0.0764	0.0658	32.59	25.75	22.18
500	0.1675	0.1753	0.1453	56.45	59.08	48.97
250	0.1333	0.1314	0.1560	44.93	44.29	52.58
125	0.2175	0.2493	0.2487	73.31	84.02	83.82
62	0.2531	0.2726	0.3285	85.31	91.88	110.72
31	0.3061	0.3033	0.2859	103.17	102.22	96.36
15	0.3940	0.4142	0.5703	132.79	139.60	192.21
0	0.3032	0.3089	0.2780	102.19	104.11	93.70

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 41 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของเซลล์ RAW 264.7 macrophage

ความเข้มข้นของสารสกัด	OD570			ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
(µg/ml)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	0.0384	0.0159	0.0025	12.94	5.36	0.84
500	0.1957	0.2036	0.2414	65.96	68.62	81.36
250	0.1833	0.1951	0.1882	61.78	65.76	63.43
125	0.1631	0.2624	0.2681	54.97	88.44	90.36
62	0.2791	0.2652	0.3603	94.07	89.38	121.44
31	0.2640	0.2787	0.2664	88.98	93.93	89.79
15	0.3055	0.5678	0.4674	102.97	191.37	157.53
0	0.3032	0.3089	0.2780	102.19	104.11	93.70

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ผ

ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ต่อการมีชีวิตของไรทะเ

ตารางที่ 42 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	การมีชีวิตรอดของไรทะเล									ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3					
	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่3
1000	3	0	3	9	0	9	9	0	9	100.00	100.00	100.00
500	12	3	15	13	1	14	15	0	15	80.00	92.86	100.00
250	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
125	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
62	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
31	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
15	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
7	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
0	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 43 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	การมีชีวิตรอดของไรทะเล									ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3					
	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	8	1	9	7	0	7	7	0	7	88.89	100.00	100.00
500	8	1	9	11	0	11	11	2	13	88.89	100.00	84.62
250	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
125	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
62	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
31	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
15	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
7	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
0	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 44 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	การมีชีวิตรอดของไรทะเล									ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3					
	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	8	0	8	10	3	13	9	3	12	100.00	76.92	75.00
500	10	2	12	2	0	2	14	1	15	83.33	100.00	93.33
250	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
125	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
62	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
31	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
15	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
7	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
0	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00

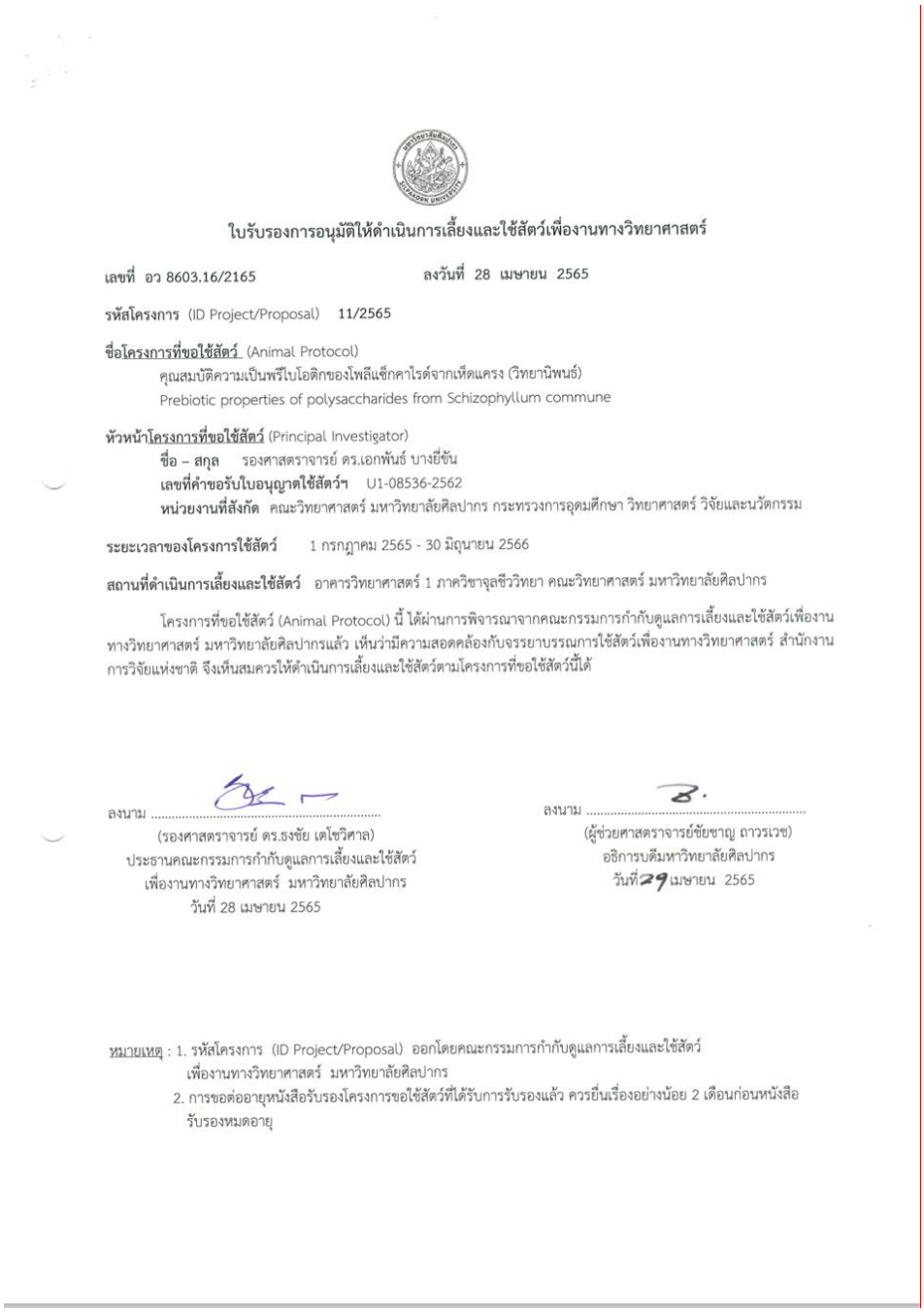
ตารางที่ 45 ผลของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดต่อการมีชีวิตของไรทะเล

	การมีชีวิตรอดของไรทะเล									ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3					
	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	11	1	12	7	1	8	2	0	2	91.67	87.50	100.00
500	14	1	15	9	0	9	9	0	9	93.33	100.00	100.00
250	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
125	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
62	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
31	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
15	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
7	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
0	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 46 ผลของ Potassium dichromate ต่อการมีชีวิตของไรทะเล

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/ml)	การมีชีวิตรอดของไรทะเล									ร้อยละของการมีชีวิตรอด		
	ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2			ซ้ำที่ 3					
	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	จำนวนที่รอดตาย (ตัว)	จำนวนที่ตาย (ตัว)	จำนวนที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด (ตัว)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
1000	0	10	10	0	10	8	0	10	10	0.00	0.00	0.00
500	0	10	10	0	10	9	0	10	10	0.00	0.00	0.00
250	0	10	10	0	10	10	0	10	10	0.00	0.00	0.00
125	0	10	10	0	10	10	0	10	10	0.00	0.00	0.00
62	0	10	10	0	10	10	1	9	10	0.00	0.00	10.00
31	6	1	7	2	1	3	2	0	2	85.71	66.67	100.00
15	7	1	8	10	0	10	10	0	10	87.50	100.00	100.00
7	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00
0	10	0	10	10	0	10	10	0	10	100.00	100.00	100.00

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไรทะเลได้รับการอนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ U1-08536-2562)



ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

เลขที่ อว 8603.16/2165 ลงวันที่ 28 เมษายน 2565

รหัสโครงการ (ID Project/Proposal) 11/2565

ชื่อโครงการที่ขอใช้สัตว์ (Animal Protocol)
คุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดแครง (วิทยานิพนธ์)
Prebiotic properties of polysaccharides from Schizophyllum commune

หัวหน้าโครงการที่ขอใช้สัตว์ (Principal Investigator)
ชื่อ – สกุล รองศาสตราจารย์ ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน
เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ฯ U1-08536-2562
หน่วยงานที่สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

ระยะเวลาของโครงการใช้สัตว์ 1 กรกฎาคม 2565 - 30 มิถุนายน 2566

สถานที่ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ อาคารวิทยาศาสตร์ 1 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

โครงการที่ขอใช้สัตว์ (Animal Protocol) นี้ ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรแล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ตามโครงการที่ขอใช้สัตว์นี้ได้

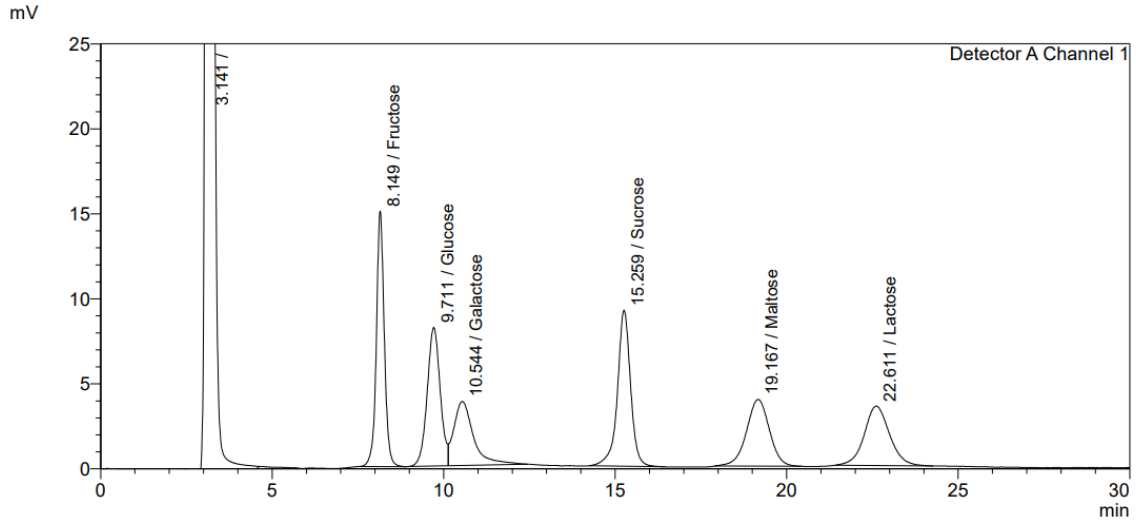
ลงนาม .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล)
ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วันที่ 28 เมษายน 2565

ลงนาม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัยชาญ ถาวรเวช)
อธิการบดีมหาวิทยาลัยศิลปากร
วันที่ 29 เมษายน 2565

หมายเหตุ : 1. รหัสโครงการ (ID Project/Proposal) ออกโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์
เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. การขออายุหนังสือรับรองโครงการขอใช้สัตว์ที่ได้รับการรับรองแล้ว ควรยื่นเรื่องอย่างน้อย 2 เดือนก่อนหนังสือรับรองหมดอายุ

ภาคผนวก ฝ

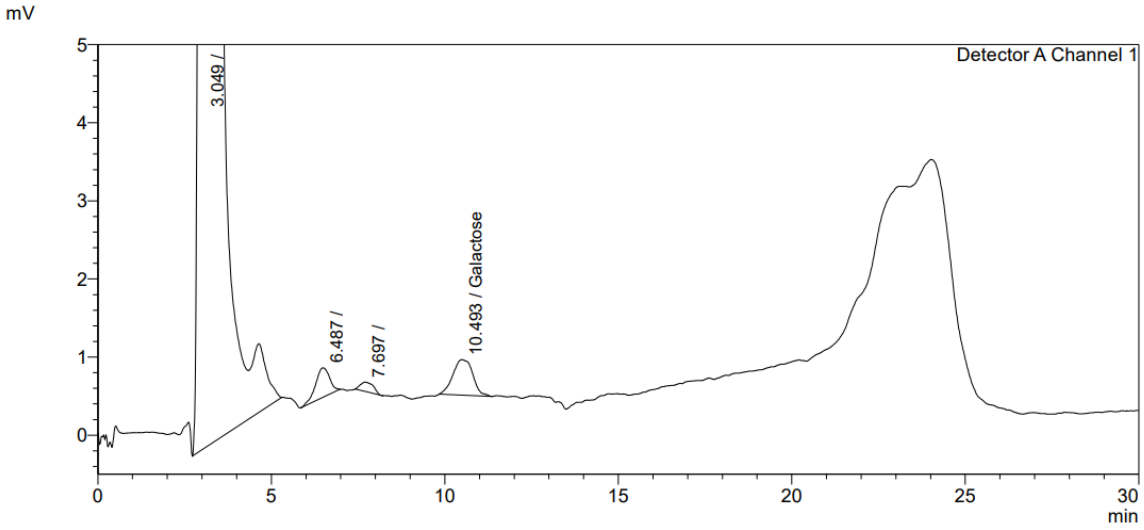
การวิเคราะห์น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์ในสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



ภาพที่ 8 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน ฟรักโตส กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส แลคโตส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 47 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมสารมาตรฐาน ฟรักโตส กลูโคส กาแลคโตส ซูโครส มอลโตส และแลคโตสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

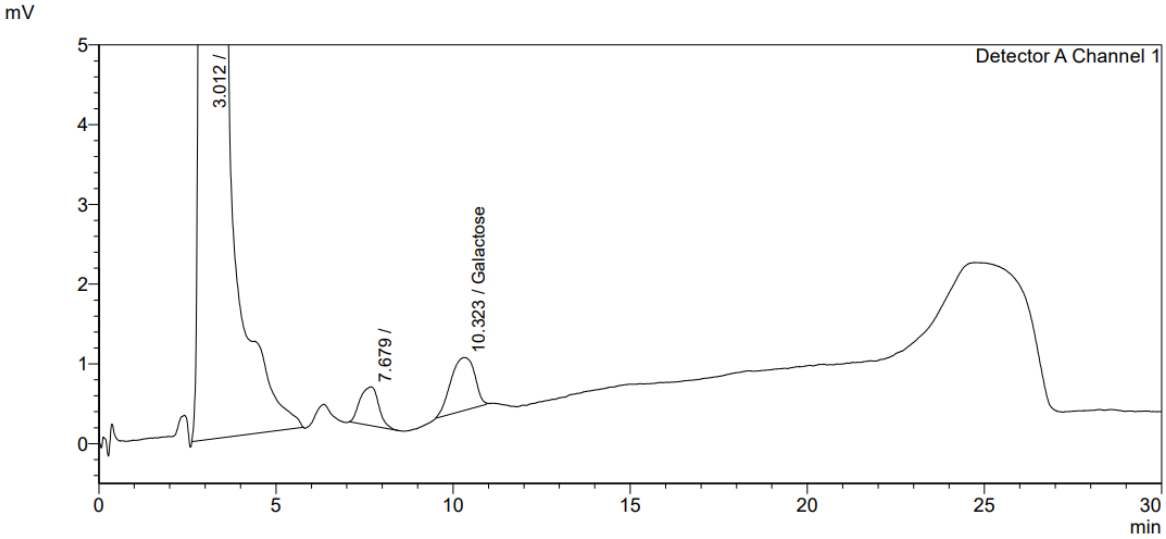
พีค	Retention time	พื้นที่	ความสูง	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	สารมาตรฐาน
1	3.141	2377816	182079	0.000	-
2	8.149	240534	15003	0.998	ฟรักโตส
3	9.711	215814	8146	1.002	กลูโคส
4	10.544	150093	3763	1.003	กาแลคโตส
5	15.259	244874	9180	0.997	ซูโครส
6	19.167	182323	3924	0.990	มอลโตส
7	22.611	178795	3490	1.005	แลคโตส



ภาพที่ 9 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 48 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

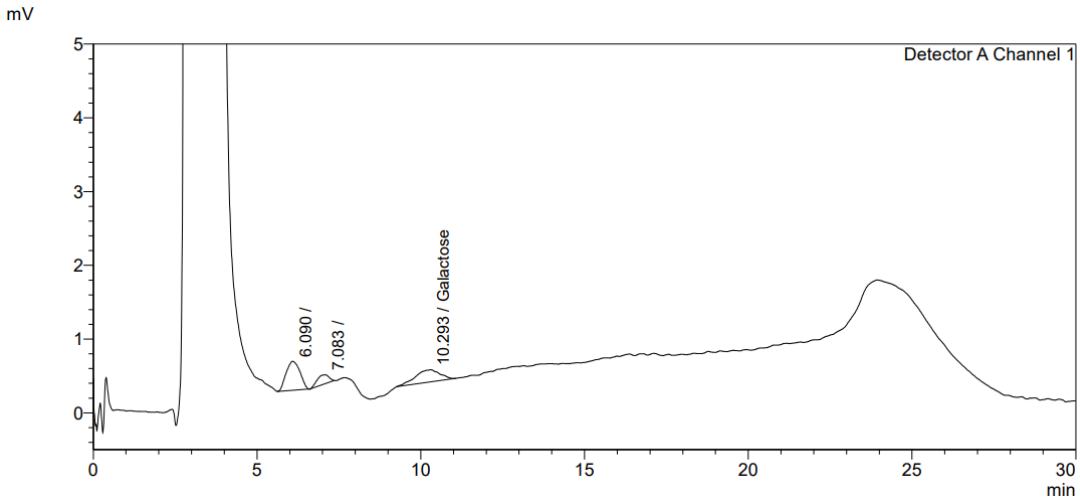
พีค	Retention time	พื้นที่	ความสูง	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	สารมาตรฐาน
1	3.049	14827740	696353	0.000	-
2	6.487	10725	378	0.000	-
3	7.697	3207	118	0.000	-
4	10.493	18137	454	0.274	กาแลคโตส



ภาพที่ 10 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 49 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

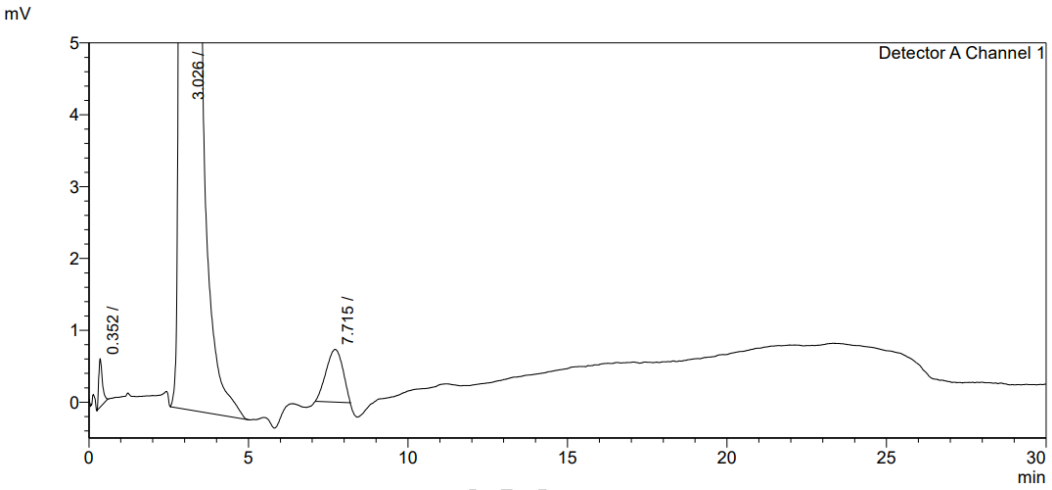
พีค	Retention time	พื้นที่	ความสูง	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	สารมาตรฐาน
1	3.012	16723768	607095	0.000	-
2	7.679	17586	485	0.000	-
3	10.323	31152	662	0.351	กาแลคโตส



ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 50 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากเส้นใยในถุงเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

พีค	Retention time	พื้นที่	ความสูง	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	สารมาตรฐาน
1	6.090	11495	393	0.000	-
2	7.083	3219	118	0.000	-
3	10.293	8771	164	0.219	กาแลคโตส



ภาพที่ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ด จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ตารางที่ 51 Retention time พื้นที่ ความสูง และความเข้มข้นจากพีคในโครมาโตแกรมของสารสกัดโพลีแซ็กคาไรด์จากขี้เลื่อยถุงเห็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

พีค	Retention time	พื้นที่	ความสูง	ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	สารมาตรฐาน
1	0.352	5449	677	0.000	-
2	3.026	15672834	753612	0.000	-
3	7.715	26645	734	0.000	-

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิชญา ประเวชไพร
วัน เดือน ปี เกิด	26 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	ตราด
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	38 หมู่ 6 ตำบลประณีต อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด 23150