ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ ฟีนอล และฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ดหิ้งพิมาน (*Phellinus linteus*) ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

Total contents of polysaccharide, phenol and flavonoid, and antioxidant activity of crude hot boiling-water extract from cultured mycelia of *Phellinus linteus*

ชลลดา ไม้งาม,[1] ประไพรัตน์ สีพลไกร,[2] นิภาพร ชุติมันต์,[3] พนิดา เล้าชาญวุฒิ,[4] ประยุกต์ ศรีวิไล[5]

Chonlada Maingam,[1] Prapairat Seephonkai,[2] Nipaporn Chutiman,[3] Panida Loutchanwoot,[4] Prayook Srivilai[5]

Received: 26 January 2017; Accepted: 27 April 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng ที่เพาะเลี้ยง และสกัดด้วยน้ำต้มเดือด วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี 2,2-ไดฟีนิล-1-ฟีคิลไฮดราซิล ผลการวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์รวม คือ อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร โดยทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุดเท่ากับ 577.65 ± 29.76 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (P<0.05) พบมอนอแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส แรมโนส และฟูโคส ในปริมาณเท่ากับ 397.75 18.20 34.42 และ 56.37 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 13.94 ± 2.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ในสภาวะที่ไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร ระยะเวลาสกัด 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณฟีนอลรวมสูงสุดเท่ากับ 63.74 ± 0.67 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (P<0.05) ที่ระยะเวลาสกัด 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 508.58 ± 16.81 และ515.25 ± 5.61 มิลลิลิตรของเควอเซตินต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (P<0.05) ตามลำดับ และมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 243.25 ± 30.82 และ 279.02 ± 11.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (P<0.05) ตามลำดับ และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ (%RSA) เท่ากับ 84.85 ± 8.90 และ 78.37 ± 1.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: เห็ด พอลิแซ็กคาไรด์ ฟีนอล สารต้านอนุมูลอิสระ

---

[1] นิสิตปริญญาโท, [4] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [5] รองศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[3] รองศาสตราจารย์ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1] Master degree student, [4] Assistant Professor, [5] Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand

[2] Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand

[3] Associate Professor, Department of Mathematics, Faculty of Science, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand

[*] Corresponding Author: Prayook Srivilai (Ph.D.), Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham Province 44150, Thailand. E-mail address: prayook.s@msu.ac.th Alternate E-mail address: prayooks@hotmail.com

Abstract

This research is aimed to determine the optimal conditions for the production of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. The major bioactive compounds in the extract were investigated. Determination of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate (DPPH) radical oxidation caused by the crude mycelial extract of *P. linteus* was performed for testing antioxidant activity. The results showed that under the optimized conditions for the extraction of total polysaccharides, i.e., 1:60 of the ratio of dried mycelia to water with homogenization and the extraction time of 6 hours, the maximum extraction yield was obtained (577.65 ± 29.76 mg/g of crude extract; $P<0.05$). Four types of monosaccharides, i.e., glucose, mannose, rhamnose and fucose, were found at 397.75, 18.20, 34.42 and 56.37 mg/g of crude extract, respectively. The content of total protein was 13.94 ± 2.33 mg/g of crude extract. Under the optimized conditions without homogenization, i.e., 1:60 of the ratio of dried mycelia to water and the extraction time of 6 hours, the maximum extraction yield of total phenols was obtained to 63.74 ± 0.67 mg of gallic acid eguivalent/g of crude extract ($P<0.05$). Under the extraction periods of 3 and 6 hours, respectively, total flavonoids were obtained with the maximum yields of 508.58 ± 16.80 and 515.25 ± 5.61 mg of quercetin equivalent/g of crude extract ($P<0.05$), which possessed the maximum DPPH radical scavenging activities with the IC_{50} values of 243.25 ± 30.82 and 279.02 ± 11.20 µg/ml ($P<0.05$), and at the concentration of 1000 µg/ml of crude extract, the highest %RSA of 84.85 ± 8.90 and 78.37 ± 1.22 were obtained.

Keywords: Mushroom, Polysaccharide, Phenol, Antioxidant

บทนำ

เห็ด *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. วงศ์ Hymenochaetaceae[1] มีฤทธิ์ทางยาสูง และออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย โดยมีการนำเห็ดชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านส่งเสริมสุขภาพและใช้เป็นยาสมุนไพร[1] จากผลการวิจัยที่ผ่านมา[2-17] พบว่าสารสกัดจากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ด *P. linteus* มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysacchgaride) และโปรติโอไกลแคน (proteoglycan) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอก[2-5] และมะเร็งชนิดต่าง ๆ[2,6-9] ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและป้องกันโรคเบาหวาน[10,11] ฤทธิ์ปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน[12,13] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[14-16] และฤทธิ์ต้านความเป็นพิษต่อตับ[17]

อนุมูลอิสระหลายอย่างมีส่วนเกี่ยวข้องในอุบัติการณ์ของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจและสมองขาดเลือดมาหล่อเลี้ยง ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โรคเบาหวาน โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) การอักเสบ โรคมะเร็งระยะเริ่มต้น และเกี่ยวข้องในกระบวนการชราภาพ[18,19] เป็นต้น ปัจจุบันมีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยรักษาอาการเจ็บป่วยจากภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เพราะสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระจึงป้องกันเซลล์และเนื้อเยื่อจากความเสียหายของอนุมูลอิสระ[20] สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิด เช่น บิวทิลเลท ไฮดรอกซิลอะนิโซล (butylated hydroxyanisole) และบิวทิลเลท ไฮดรอกซิลโทลูอีน (butylated hydroxytoluene) ก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ[21,22] ดังนั้นความต้องการสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยจึงเพิ่มมากขึ้น

จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของเห็ด *P. linteus* ส่งผลให้ดอกเห็ดที่พบในสภาพธรรมชาติมีจำนวนน้อยลง อีกทั้งการเจริญเติบโตของดอกเห็ดในสภาพธรรมชาติใช้เวลานานหลายสิบปี ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ด *P. linteus* ในสภาวะห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากเพื่อทำให้เกิดผลผลิตที่เพียงพอต่อความต้องการในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม[23,24] ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารที่สกัดได้จากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* มีศักยภาพเป็นยารักษาโรคใกล้เคียงกับสารที่สกัดจากดอกเห็ดที่ได้จากธรรมชาติ แต่องค์ประกอบทางเคมีที่พบในดอกเห็ดและเส้นใยยังมีความแตกต่างกันในบางชนิด[24]

จากการศึกษาภูมิปัญญาท้องถิ่นพบว่ามีการนำเห็ดชนิดนี้มาต้มในน้ำเดือดและดื่มเพื่อบำรุงสุขภาพและรักษาโรค แต่ยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของชนิดของสาร และกรรมวิธีที่เหมาะสมในการต้มเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่

เพาะเลี้ยง และสกัดด้วยน้ำต้มเดือด วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ มอนอแซ็กคาไรด์ ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ และศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบที่ได้ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ และใช้เป็นยารักษาโรคในการแพทย์ทางเลือก นอกจากนี้ยังเป็นอีกแนวทางหนึ่งของการอนุรักษ์จำนวนและพันธุกรรมของเห็ด *P. linteus* ที่พบในสภาพธรรมชาติ

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง และสกัดด้วยน้ำต้มเดือด วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง และสกัดด้วยน้ำต้มเดือด ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ มอนอแซ็กคาไรด์ โปรตีน ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ ประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl; $C_{18}H_{12}N_5O_6$; CAS No. 1898-66-4; MW 394.32 g/mol) กรดแกลลิก (Gallic acid; $(HO)_3C_6H_2CO_2H$; MW 170.12 g/mol; CAS No. 149-91-7) เควอเซติน (Quercetin; $C_{15}H_{10}O_7$; MW 302.24 g/mol; ≥ 95%; CAS No. 117-39-5) วิตามินซี (Ascobic acid; $C_6H_8O_6$; MW 176.124 g/mol; CAS No. 50-81-70) ดี-กลูโคส (D-glucose; $C_6H_{12}O_6$; 180.156 g/mol; ≥99%; CAS No 50-99-7) ดี-แอราบิโนส (D-arabinose; $C_5H_{10}O_5$; MW 150.13 g/mol; ≥98%; CAS No 147-81-9) ดี-ฟรุกโทส (D-fructose $C_6H_{12}O_6$; MW 180.156 g/mol; ≥99%; CAS No 57-48-7) แอล-ฟูโคส (L-fucose; $C_6H_{12}O_5$; MW 164.157 g/mol; ≥99%; CAS No 87-96-7) ดี-กาแลกโทส (D-galactose; $C_6H_{12}O_6$; MW 180.156 g/mol; ≥99%; CAS No 10257-28-0) ดี-แมนโนส (D-mannose; $C_6H_{12}O_6$; MW 180.156; ≥99%; CAS No 530-26-7) แอล-แรมโนส (L-rhamnose; $C_6H_{12}O_5$; MW 164.157 g/mol; ≥99%; CAS No 10485-94-6) ดี-ไซโลส (D-xylose; $C_5H_{10}O_5$; MW 150.13 g/mol; ≥99%; CAS No 58-86-6) ดี-เทรฮาโลส (D-trehalose; $C_{12}H_{22}O_{11}$; MW 342.297 g/mol; CAS No 99-20-7) ผลิตโดยบริษัท Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา เมทานอล (Methanol; CH_3OH; MW 32.04 g/mol; CAS No. 67-56-1) และน้ำยาโฟลิน- ซีโอแคลทู (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) ผลิตโดยบริษัท MERCK ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี และน้ำปราศจากไอออน (deionized water)

เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) รุ่น 10A (บริษัท Shimadzu Cooperation Analysis & Measuring Instruments Division Kyoto ประเทศญี่ปุ่น)

เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น Rotavapor 215 (บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด Ultraviolet-Visible Spectrophotometer รุ่น Genesys 20 (บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer) รุ่น Polytron PT2100 (บริษัท Kinematica ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

นำตัวอย่างเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ในสภาพธรรมชาติ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรา กาญจนรัช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มาเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 28 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมซึ่งพัฒนาขึ้นเองโดยคณะผู้วิจัย

3. การเตรียมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง

ทำการเตรียมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นเองโดยคณะผู้วิจัย โดยนำเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ 2x3x3 factorial design โดยมีปัจจัย 3 ปัจจัยดังนี้

การทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น (homogenization) โดยใช้ความเร็วรอบ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น (without homogenization)

ระยะเวลาการต้มสกัดในน้ำต้มเดือดมี 3 ระดับ คือ 3 6 และ 12 ชั่วโมง

อัตราส่วนของเส้นใยต่อน้ำมี 3 ระดับ คือ 1:20 1:40 และ 1:60 กรัมต่อมิลลิลิตร

นำเส้นใยที่แบ่งแยกชุดการทดลอง มาสกัดด้วยน้ำต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เมื่อครบกำหนดเวลา กรองเอาตะกอนออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที และกรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และทำให้แห้งแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บสารสกัดหยาบไว้ในที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในสารสกัดหยาบที่ได้ในขั้นตอนต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมด้วยวิธีมาตราฐานฟีนอล-กรดซัลฟูริก[25,26]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแก้ว ผสมกับสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4; 95-97 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเขย่านาน 30 วินาที นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ช่วงความเข้มข้น 5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม[27] โดยมีขั้นตอนและวิธีการตามที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตชุดน้ำยา Bradford สำเร็จรูป (Quick start Bradford protein assay kit, บริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเตรียมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแก้วผสมกับสารละลาย 1x Dye reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ช่วงความเข้มข้น 1.25-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

6. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของมอโนแซ็กคาไรด์ โดยใช้เทคนิค HPLC

นำสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ผ่านการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid)[28,29] ปริมาณ 0.3 มิลลิกรัม มาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่านที่กรองไนลอน ขนาดรู 0.45 ไมครอน ลงในขวดแก้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของมอนอแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้เครื่อง HPLC และคอลัมน์ Aminex รุ่น HPX-87H ขนาด 300 mm x 7.8 mm พร้อมด้วย Bio-Rad micro-guard cartridges ขนาด 30 x 4.6 mm ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยดัดแปลงวิธีและขั้นตอนการวิเคราะห์มาจากคู่มือการใช้เครื่อง (Guide to Aminex HPLC Columns, 2011) อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร และระยะเวลาที่ใช้ 40 นาทีต่อตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานของสารละลายมอนอแซ็กคาไรด์ 9 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แอราบิโนส ฟรุกโทส ฟูโคส กาแลกโทส แมนโนส แรมโนส ไซโลส และเทรฮาโลส ที่ช่วงความเข้มข้น 25-3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม ด้วยวิธีมาตรฐานโฟลิน-ซิโอแคลทู[30]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแก้ว ผสมกับน้ำยาโฟลิน-ซิโอแคลทู (รีเอเจนต์) เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ช่วงความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

8. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (ดัดแปลงจากวิธีของ Zhishen และคณะ, 1999)[31]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแก้ว เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมโดยเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเควอเซติน ที่ช่วงความเข้มข้น 2-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง

9. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay[32]

เตรียมสารละลายของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมไว้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดีพีพีเอชในเมทานอล ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ (Percentage of radical scavenging activity; %RSA) นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ต่ำสุดที่สารละลายตัวอย่างสามารถกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้ 50 เปอร์เซ็นต์หรือเรียกว่าค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับ IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเควอเซตินและวิตามินซี โดยการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำเพื่อหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus*

10. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc test) โดยเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparison) โดยใช้วิธี Tukey's HSD post hoc test ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (IC_{50}) กับปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวม ประเมินโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; r) ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (version 11.5 บริษัท SPSS ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ผลการวิจัย

1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีมาตรฐานฟีนอล-กรดซัลฟูริก โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2 เมื่อทดสอบปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลร่วมกัน และค่าเฉลี่ยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของแต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้ง 3 ปัจจัย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของกลุ่ม a ในสภาวะการสกัดที่ใช้อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร โดยมีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด (P<0.05) เท่ากับ 577.65 ± 29.76 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีของ Bradford[30] โดยใช้สารละลาย Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2 เมื่อทดสอบปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลร่วมกัน และค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนรวมของแต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้ง 3 ปัจจัย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนรวมของกลุ่ม a ในสภาวะการสกัดที่ใช้อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร โดยมีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด (P<0.05) เท่ากับ 54.76 ± 1.03 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ

3. ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณมอนอแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของมอนอแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 3 โดยเปรียบเทียบระยะเวลาที่สารสกัดหยาบใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) กับมอนอแซ็กคาไรด์มาตรฐาน และคำนวณปริมาณมอนอแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานมอนอแซ็กคาไรด์ ได้แก่ เทรฮาโลส กลูโคส แมนโนส ไซโลส แรมโนส ฟรักโทส ฟูโคส และแอราบิโนส พบชนิดของมอนอแซ็กคาไรด์ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส แรมโนส และฟูโคส ซึ่งปริมาณของกลูโคสมีมากที่สุดเท่ากับ 16.78-556.47 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอแคลทู โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานฟีนอล ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2 เมื่อทดสอบปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลร่วมกัน และค่าเฉลี่ยปริมาณฟีนอลรวมของแต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้ง 3 ปัจจัย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณฟีนอลรวมของกลุ่ม a ในสภาวะการสกัดที่ใช้อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร โดยไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด (P<0.05) เท่ากับ 63.74 ± 0.67 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ

5. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Zhishen และคณะ (1999)[29] โดยใช้เควอเซตินเป็นสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2 เมื่อทดสอบปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลร่วมกัน และค่าเฉลี่ยปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของแต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้ง 3 ปัจจัย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของกลุ่ม a ในสภาวะการสกัดที่ใช้อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร โดยไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 3 และ 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด (P<0.05) เท่ากับ 508.58 ± 16.81 และ 515.25 ± 5.61 มิลลิกรัมของเควอเซตินต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยวิธีดีพีพีเอชได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน Table 1 และ Table 2 เมื่อทดสอบปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยร่วมกัน พบว่าปัจจัยทั้ง 3 มีอิทธิพลร่วมกัน และค่าเฉลี่ยค่า IC_{50} แต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทั้ง 3 ปัจจัย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยค่าเฉลี่ยในกลุ่ม i ในสภาวะการสกัดที่อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร โดยไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 3 และ 6 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (มีประสิทธิภาพต้านออกซิเดชันดีที่สุด) เท่ากับ 243.25 ± 30.82 และ 279.02 ± 11.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (P<0.05) และที่ความความเข้ม 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ (%RSA) สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 84.85 ± 8.90 และ 78.37 ± 1.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐานเควอเซตินและวิตามินซี ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.97 ± 2.75 และ 8.189 ± 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 93.14 ± 0.05 และ 93.24 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลจากทุกชุดการทดลองมาสร้างกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณของฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* โดยประเมินจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า IC_{50} กับปริมาณฟีนอลรวมของชุดการทดลองทั้งที่มีและไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.801 และ 0.775 (P<0.05) ตามลำดับ ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมีค่าเท่ากับ 0.839 และ 0.827 (P<0.05) ตามลำดับ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} กับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม มีค่าเท่ากับ

0.016 และ 0.399 (P<0.05) ตามลำดับ (Table 4; Figure 1)

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ทำการประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด และแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงมีชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ รวมทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. linteus* ที่พบในสภาพธรรมชาติ

จากการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธีมาตรฐานฟีนอล-กรดซัลฟูริก พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ของแต่ละกลุ่มทดลองในแต่ละชุดการทดลองมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์รวม คือ อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร โดยทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาที่ใช้ในการต้มสกัดในน้ำต้มเดือด 6 ชั่วโมง มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ 577.65 ± 29.76 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (P<0.05) คิดเป็น 57.76 เปอร์เซ็นต์ โดยมีมอนอแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส แรมโนส และฟูโคส ในปริมาณเท่ากับ 397.75 18.20 34.42 และ 56.37 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 13.94 ± 2.33 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดหยาบ (P<0.05) คิดเป็น 1.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากพบโปรตีนในปริมาณที่น้อยกว่าของงานวิจัยก่อนหน้านี้[28,33-36]

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากสารสกัดดอกเห็ด *P. linteus* ด้วยน้ำต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง และตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม คิดเป็น 72.2 เปอร์เซ็นต์ พบมอนอแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส และกาแลกโทส ในอัตราส่วนเท่ากับ 23.8 41.6 และ 23.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนรวมคิดเป็น 22.3 เปอร์เซ็นต์[34] และจากการสกัดดอกเห็ด *P. linteus* ด้วยน้ำต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง และตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ และไดอะไลซิส (dialysis) ได้สารสกัดหยาบซึ่งประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซ็กคาไรด์-โปรตีน (polysaccharide protein complex) โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมและโปรตีนรวม คิดเป็น 73 และ 16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบมอนอแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส กาแลกโทส ฟรุกโทส และ กลูโคซามีน (glucosamine) ในอัตราส่วนเท่ากับ 61.9 19.5 5.5 4.9 และ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ[35] การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากดอกเห็ด *P. linteus* ที่สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส โดยทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาการสกัด 4-5 วัน และตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุดเท่ากับ 96.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 1.7 เปอร์เซ็นต์[31] และพบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด *P. linteus* ที่ใช้วิธีการสกัดเดียวกับของ Wei และคณะ (2008) มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ คิดเป็น 62.6 เปอร์เซ็นต์[37] จากการศึกษาเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 12 ชั่วโมง และตกตะกอนในเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมเท่ากับ 82.5 เปอร์เซ็นต์ พบมอนอแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส แมนโนส กาแลกโทส แอราบิโนส และไซโลส ในอัตราส่วนเท่ากับ 21.1 44.2 24.1 7.0 และ 3.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณโปรตีนรวม เท่ากับ 13.2 เปอร์เซ็นต์[25] การศึกษาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดจากเส้นใยของเห็ด*P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง และสกัดด้วยน้ำต้มเดือด อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 10 มิลลิลิตร ระยะเวลาการสกัด 10 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมและโปรตีนรวม คิดเป็น 83.2 และ 6.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ[36]

ดังนั้นจากการศึกษาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ชนิดและปริมาณของมอนอแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมา[25,31,35-37] พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่ได้มีความแตกต่างกัน รวมถึงองค์ประกอบและปริมาณของมอนอแซ็กคาไรด์ และความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการสกัด ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ลักษณะ และคุณสมบัติเฉพาะทางเคมี รวมทั้งสภาพขั้วของทั้งตัวทำละลายและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จำนวนของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด สภาวะขั้นตอนและวิธีการสกัดที่ทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่างๆ

ของเห็ดแตกต่างกัน เช่น ชนิดของตัวทำละลาย ระยะเวลา อุณหภูมิ ตลอดจนสิ่งรบกวนต่างๆ ในขั้นตอนการสกัด เป็นต้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงในงานวิจัยครั้งนี้มีปริมาณ เท่ากับ 57.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าของดอกเห็ด[34,35] ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของอายุ อาหาร สภาพแวดล้อมของการเจริญเติบโตของดอกเห็ดในสภาพธรรมชาติและของเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตขึ้นและสกัดได้ แต่ในแง่ของวิธีการสกัด พบว่างานวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดโดยต้มในน้ำเดือด ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก และเป็นวิถีภูมิปัญญาท้องถิ่นซึ่งคนส่วนใหญ่สามารถทำเองได้ นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงมีปริมาณกลูโคสมากกว่าของงานวิจัยอื่น[25,34,35] ซึ่งกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ต่างๆ ของร่างกายและมีจตนฤคความสำคัญอย่างมากเกี่ยวกับการทำงานของสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม โดยในสมองของผู้ใหญ่เซลล์ประสาทต้องการพลังงานมากที่สุดโดยกลูโคสจากกระแสเลือดต้องมีการขนส่งอย่างต่อเนื่องไปยังสมอง[38,39]

Table 1 DPPH radical scavenging activity, total contents of phenolic compounds, flavonoids and polysaccharides of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus* without homogenization condition.

Assay	3h			6h			12h		
	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)
DPPH radical scavenging activity (IC_{50})	517.87 ± 39.41^{c}	327.57 ± 15.87^{gh}	243.25 ± 30.82^{i}	484.89 ± 92.81^{c}	335.80 ± 27.56^{gh}	279.02 ± 11.20^{hi}	540.99 ± 50.09^{c}	326.98 ± 25.55^{d}	308.91 ± 3.02^{gh}
Total phenolic content (mg GAE/ g of crude extract)	22.43 ± 2.49^{jk}	27.47 ± 1.20^{hi}	54.74 ± 4.30^{b}	27.19 ± 3.00^{hi}	34.80 ± 2.10^{f}	63.74 ± 0.67^{a}	33.61 ± 3.44^{fg}	39.93 ± 1.30^{de}	56.35 ± 5.08^{b}
Total flavonoid content (mg QE/ g of crude extract)	234.71 ± 15.13^{e}	409.61 ± 57.07^{c}	508.58 ± 16.81^{a}	343.71 ± 12.15^{d}	470.50 ± 12.87^{b}	515.25 ± 5.61^{a}	218.83 ± 22.52^{e}	409.37 ± 6.27^{c}	438.14 ± 26.27^{bc}
Polysaccharides content (mg / g of crude extract)	291.52 ± 13.17^{l}	365.17 ± 24.40^{ijk}	411.00 ± 12.61^{efghi}	534.15 ± 20.23^{abc}	393.53 ± 12.53^{ghij}	428.50 ± 40.92^{efghi}	449.27 ± 17.01^{defg}	513.99 ± 31.07^{abcd}	365.62 ± 31.69^{ijk}
Protein content (mg / g of crude extract)	17.83 ± 0.06^{j}	35.45 ± 0.25^{d}	21.09 ± 0.28^{hi}	18.64 ± 0.37^{ij}	22.24 ± 0.21^{gh}	25.52 ± 0.75^{f}	16.94 ± 0.20^{j}	21.34 ± 0.79^{hi}	21.16 ± 0.17^{hi}

Values are expressed as means ± S.E.M. of triplicate measurements. Means with different letters were statistically significant differences (P<0.05; One-way ANOVA with post hoc Tukey's HSD test).

Table 2 DPPH radical scavenging activity, total contents of phenolic compounds, flavonoids and polysaccharides of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus* under homogenization condition.

Assay	3h			6h			12h		
	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)
DPPH radical scavenging activity (IC_{50})	960.08 ± 79.12^{a}	701.66 ± 14.16^{b}	414.71 ± 1.16^{df}	927.58 ± 29.43^{a}	345.84 ± 4.54^{g}	365.47 ± 7.17^{dfg}	1015.6 ± 20.80^{a}	352.454 ± 5.57^{fg}	749.41 ± 11.94^{b}
Total phenolic content (mg GAE/ g of crude extract)	16.51 ± 0.54^{l}	26.56 ± 1.35^{hij}	29.60 ± 0.62^{gh}	25.08 ± 0.89^{ij}	43.41 ± 0.54^{cd}	36.54 ± 1.17^{ef}	19.20 ± 0.54^{kl}	46.83 ± 0.67^{c}	29.07 ± 0.82^{hi}
Total flavonoid content (mg QE/ g of crude extract)	60.89 ± 1.49^{j}	54.44 ± 4.30^{i}	101.78 ± 8.33^{gh}	57.07 ± 3.33^{i}	134.34 ± 6.88^{fg}	138.82 ± 7.74^{f}	51.30 ± 4.16^{i}	133.03 ± 4.41^{fg}	68.56 ± 4.44^{hi}
Polysaccharides content (mg / g of crude extract)	447.22 ± 30.93^{defgh}	400.13 ± 25.23^{fghij}	335.32 ± 7.57^{jkl}	577.65 ± 29.76^{a}	313.09 ± 13.35^{kl}	379.23 ± 64.70^{hijk}	479.23 ± 40.73^{bcde}	465.48 ± 64.51^{cdef}	535.32 ± 75.00^{ab}
Protein content (mg / g of crude extract)	25.06 ± 2.64^{fg}	22.80 ± 0.00^{fgh}	39.31 ± 0.13^{c}	13.94 ± 2.33^{k}	47.37 ± 0.33^{b}	54.76 ± 1.03^{a}	10.76 ± 0.41^{l}	30.34 ± 0.52^{e}	18.51 ± 2.12^{ij}

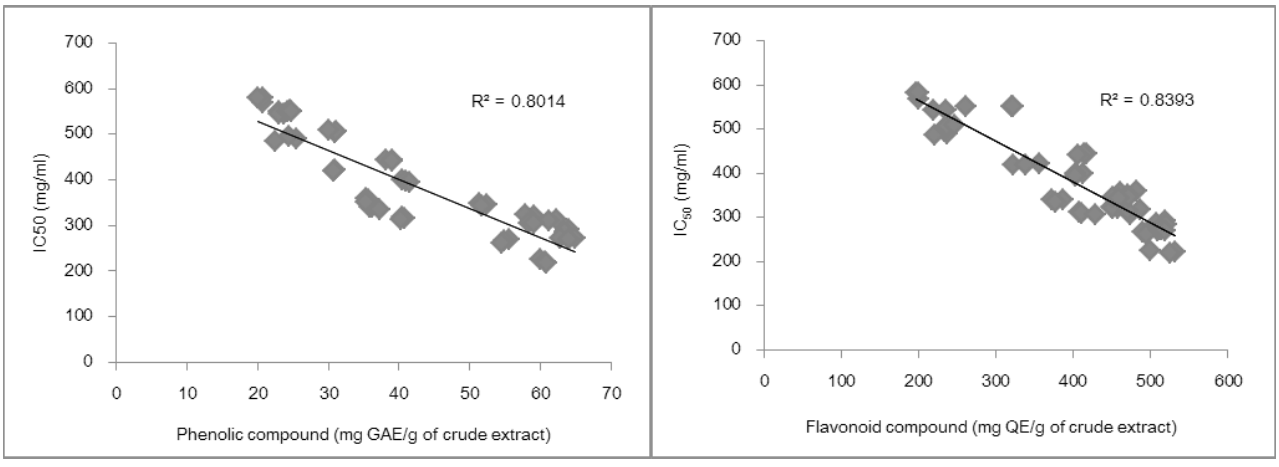
Values are expressed as means ± S.E.M. of triplicate measurements. Means with different letters were statistically significant differences (P<0.05; One-way ANOVA with post hoc Tukey's HSD test).

Table 3 Monosaccharides content of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus*

Monosaccharides (mg/g of crude extract)	Without homogenization condition									With homogenization								
	3h			6h			12h			3h			6h			12h		
	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)	(1:20)	(1:40)	(1:60)
Glucose	nd	nd	nd	395.07	nd	311.40	nd	351.89	nd	451.56	556.47	192.74	397.75	392.69	352.91	17.26	17.74	16.78
Mannose	nd	nd	nd	-	nd	-	nd	6.49	nd	14.37	15.14	11.19	18.20	24.61	17.99	7.25	7.27	7.27
Rhamnose	nd	nd	nd	63.24	nd	39.44	nd	52.04	nd	30.52	30.30	20.42	34.42	40.91	28.13	15.81	17.27	17.02
Fucose	nd	nd	nd	29.18	nd	31.50	nd	32.31	nd	52.43	64.45	23.22	56.37	39.01	42.51	7.74	8.36	8.75

nd = not determined

- = not found



(a) (b)

Figure 1 The correlation between the IC_{50} values of antioxidant activities and total phenolic content (a), total flavonoid content (b) of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus* without homogenization condition.

Table 4 Correlation of the total contents of different bioactive components of crude hot boiling-water extract from the cultured mycelia of *Phellinus linteus*.

Relation	Correlation coefficient
IC_{50} and phenolic content (without-homogenization)	r = 0.801
IC_{50} and phenolic content (homogenization)	r = 0.775
IC_{50} and flavonoid content (without-homogenization)	r = 0.839
IC_{50} and flavonoid content (homogenization)	r = 0.828
IC_{50} and polysaccharide content (without-homogenization)	r = 0.012
IC_{50} and polysaccharide content (homogenization)	r = 0.399

โปรตีนที่พบในเห็ดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์[40] เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน[41] ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้องอก[42] งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือด พบว่าปริมาณโปรตีนรวมที่ได้มีน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ด้วยน้ำต้มเดือดอาจไม่ใช่แหล่งที่ดีของโปรตีน

ฟีนอลที่พบในเห็ดทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ[43] การต้านและกำจัดอนุมูลอิสระเป็นหนึ่งในกลไกของการยับยั้งการผลิตและกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของลิพิด (lipid) วิธีการกำจัดสารอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสามารถนำมาใช้ในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบหรือสารสกัดที่เฉพาะเจาะจงโดยใช้ระยะเวลาการทดสอบสั้นและมีประสิทธิภาพ[44] งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าวิธีการและสภาวะการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ในทุกกลุ่มทดลองสามารถสกัดได้ปริมาณฟีนอลรวม และฟลาโวนอยด์รวมได้ดี และส่งผลต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันของตัวอย่างแต่ละกลุ่มการทดลองที่แตกต่างกัน โดยผลของค่า IC_{50} เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของสาร ซึ่งในการวิเคราะห์ได้ทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีดีพีพีเอชโดยใช้เควอเซตินและวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่าไม่มีสารสกัดหยาบจากกลุ่มการทดลองใดแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแรงเท่ากับเควอเซตินและวิตามินซีซึ่งเป็นสารควบคุมเชิงบวก (positive control compound) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ได้จากสภาวะการสกัดที่ไม่มีกับมีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น พบว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่นเกือบทุกกลุ่มทดลองแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้สูงกว่าสารสกัดหยาบที่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น

ภายใต้สภาวะการสกัดที่ไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคือ 3 และ 6 ชั่วโมง ให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด คือมีประสิทธิภาพต้านออกซิเดชันดีที่สุด สอดคล้องกับการมีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด จากการศึกษาก่อนหน้านี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวมจากสารสกัดน้ำร้อนจากเส้นใย สารสกัดเมทานอลจากเส้นใย และจากอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ด *P. igniarius* พบว่าสารสกัดน้ำร้อนจากเส้นใยมีปริมาณ ฟีนอลรวมมากที่สุด เท่ากับ 23.14 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดเมทานอลจากเส้นใย และอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย โดยมีค่าเท่ากับ 10.06 ± 0.12 และ 6.43 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลจากเส้นใยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระมากที่สุด เท่ากับ 80.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสารสกัดน้ำร้อนจากเส้นใยและอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย เท่ากับ 43.1 และ 30.0 ตามลำดับ[45] นอกจากนี้จากการศึกษาอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใย สารสกัดเอทานอลของดอกเห็ดและเส้นใยที่เพาะเลี้ยงของเห็ด *P. igniarius* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเส้นใยและดอกเห็ด 1 กรัมต่อเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการสกัด 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกเห็ดมีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 15.35 ± 0.13 และ 10.36 ± 0.87 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 25-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเอทานอลของดอกเห็ดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระดีที่สุด คิดเป็น 93.25-95.60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารสกัดเอทานอลของเส้นใยมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระรองลงมา[45] การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด *P. gilvus P. rimosus* และ *P. badius* พบว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด *P. gilvus* มีปริมาณของฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด เท่ากับ 49.31 และ 30.58 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ และมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุด คิดเป็น 90.83 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด *P. rimosus* และ *P. badius*[47] ในการศึกษาของ Cheung และคณะ (2003)[44] พบว่าที่ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำจากดอกเห็ด *Lentinus edodes* มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (40.4 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากดอกเห็ด (29.4 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)[44] และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบของดอกเห็ดสดและแห้งของเห็ด *Lentinus* sp. สายพันธุ์ RJ-2 ที่สกัดด้วยน้ำต้มเดือด พบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชใกล้เคียงกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.418 และ 0.432 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลรวมที่พบในสารสกัดหยาบของดอกเห็ดสดและแห้ง เท่ากับ 53.08 ± 1.45 และ 51.09 ± 1.45 มิลลิกรัมต่อสารสกัดหยาบ ตามลำดับ[48] ถึงแม้ว่ายังมีสารต้านออกซิเดชันชนิดอื่นๆ อีกที่พบในสารสกัดจากเห็ดเหล่านี้ แต่ฟีนอลและ

ฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารสำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน[44]

งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงและสกัดด้วยน้ำต้มเดือดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฟีนอลรวมมากกว่าสารสกัดน้ำร้อน เมทานอล และเอทานอลจากเส้นใยและดอกเห็ด *P. igniarius*[45,46] และมีปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดเมทานอลของดอกเห็ด *P. gilvus P. rimosus* และ *P. badius*[52] จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ได้มีปริมาณมากกว่าฟีนอลรวมถึง 10 เท่า ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นที่ทราบจากรายงานก่อนหน้านี้ว่าทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่พบในเห็ด *Phellinus* spp.[44-47,54] จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากดอกเห็ดและเส้นใยของเห็ดในสกุล *Phellinus* spp. มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลหรือฟลาโวนอยด์รวมที่พบในสารสกัดจากเห็ด และสารสกัดน้ำต้มเดือดจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเทียบเท่าสารสกัดจากดอกเห็ด ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากใบเฉาก๊วย (*Mesona chinesis*) และใบหมาน้อย (*Cissampelos pareira* L.) ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร พบว่าน้ำร้อนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทั้งฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมจากใบเฉาก๊วยและใบหมาน้อย และสารสกัดจากน้ำร้อนยังให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ดังนั้นสารสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ดี[49] โดยทั่วไปสารสกัดเมทานอลและสารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดน้ำร้อน[52] แต่สารสกัดน้ำร้อนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกันโดยไม่เป็นพิษต่อร่างกายผู้บริโภค[49] นอกจากนี้การใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์เมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกิน หรืออาจมีการสะสมภายในร่างกายในระยะยาวส่งผลทำให้เกิดโรคและความผิดปกติต่างๆ ตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคตับ และความดันโลหิตสูง[53] เป็นต้น

ในเห็ดมีสารประกอบทางเคมีต่างๆ มากมาย ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่สารที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือฟีนอลและฟลาโวนอยด์ เมื่อปริมาณของฟีนอล หรือฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น[50] จากงานวิจัยนี้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลรวม ฟลาโวนอยด์รวม และพอลิแซ็กคาไรด์รวมจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลรวมและฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทุกๆ วิธีการทดสอบ ซึ่งข้อมูลที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กันในเชิงบวก สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้[49-51] และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (ค่า IC_{50}) กับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่พบในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยง พบว่าไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ชัดเจน งานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่แสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมาก

สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ ฟีนอล และ ฟลาโวนอยด์ โดยพบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด รองลงมาคือ ฟลาโวอยด์ ฟีนอล และโปรตีน ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ คือ อัตราส่วนเส้นใยแห้ง 1 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร โดยทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาที่ใช้ในการต้มสกัดในน้ำต้มเดือด 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด และพบกลูโคสเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่น้อย ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของการสกัดฟีนอล คือ อัตราส่วนเส้นใย 1 กรัมต่อน้ำ 60 มิลลิลิตร โดยที่ไม่มีการทำให้เซลล์ของเส้นใยแตกด้วยวิธีโฮโมจิไนเซชั่น ระยะเวลาที่ใช้ในการต้มสกัดในน้ำต้มเดือด 6 ชั่วโมง ได้ปริมาณฟีนอลรวมสูงสุด และที่ระยะเวลาการต้มสกัด 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด และมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด *P. linteus* ที่พบในสภาพธรรมชาติ พบว่ามีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกัน

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเห็ด *P. linteus* ที่เพาะเลี้ยงไปพัฒนาต่อยอดเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ และพัฒนาไปเป็นนวัตกรรมผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ และยารักษาโรคเพื่อใช้ในการแพทย์ทางเลือก

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และทุนอุดหนุน

การวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรา กาญจนรัช สำหรับความช่วยเหลือเรื่องตัวอย่างเห็ดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Dai YC, Cu BK. Progress on the species of medicinal fungus *Inonotus sanghuang*, J. Beijing Forestry Univ 2014;36:1-6.
2. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH et al. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology 1999;41(2): 157-64.
3. Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S, Kawagishi H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. Biosci Biotechnol Biochem 2004;68(4):868-72.
4. Kim GY, Oh WK, Shin BC, Shin YI, Park YC, Ahn SC et al. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of $CD11c^+$ $CD8^+$ DC and type I helper T cell-dominant immune state. FEBS Letters 2004;576(3):391-400.
5. Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor from peritoneal macrophages. J Ethnopharmacol 2004;95(1):69-76.
6. Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JII et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G_2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. Cancer Lett 2004;216(2):175-81.
7. Han SB, Lee CW, Kang JS, Yoon YD, Lee KH, Lee K et al. Acidic polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits melanoma cell metastasis by blocking cell adhesion and invasion. Int Immunopharmacol 2006;6(4):697-702.
8. Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ, Chen CY. *Phellinus linteus* sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. Br J Cancer 2006;95(3):282-88.
9. Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH et al. *Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. Br J Cancer 2007;96(4):583-90.
10. Kim HM, Kang JS, Kim JY, Park SK, Kim HS, Lee YJ et al. Evaluation of antidiabetic activity of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* in non-obese diabetic mouse. Int Immunopharmacol 2010;10(1): 72-8.
11. Zhao C, Liao Z, Wu X, Liu Y, Liu X, Lin Z, Huang Y, Liu B. Isolation, Purification, and Structural Features of a Polysaccharide from *Phellinus linteus* and Its Hypoglycemic Effect in Alloxan-Induced Diabetic Mice. J Food Sci 2014;79(5):1002-10.
12. Kim GY, Park SK, Lee MK, Lee SH, Oh YH, Kwak JY et al. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase. Int Immunopharmacol 2003;3(9):1281-92.
13. Li YG, Ji DF, Zhong S, Zhu JX, Chen S, Hu GY. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/ EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma. Int J Biol Macromol 2011;48(3):511-7.
14. Kim GY, Roh SI, Park SK, Ahn SC, Oh YH, Lee JD et al. Alleviation of Experimental Septic Shock in Mice by Acidic Polysaccharide Isolated from the Medicinal Mushroom *Phellinus linteus*. Biol Pharm Bull 2003;26(10):1418-23.
15. Kim BC, Jeon WK, Hong HY, Jeon KB, Hahn JH, Kim YM et al. The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curt.) is mediated through the PKC/Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. J Ethnopharmacol 2007;113(2):240-47.
16. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH et al. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-κB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. J. Ethnopharmacol 2007;114(3): 307-15.

17. Gao C, Zhong L, Jiang L, Geng C, Yao X Cao J. *Phellinus linteus* mushroom protects against tacrine-induced mitochondrial impairment and oxidative stress in $HepG_2$ cells. Phytomedicine 2013;20(8-9):705-09.
18. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 1993;262 (5134):689-95.
19. Margaill I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. Free Radic Biol Med 2005;39(4):429-43.
20. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. Br J Nutr 1998;80 (Suppl. 1):S77-S112.
21. Saito M, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisol BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). Anticancer Res 2003; 23(6C):4693-701.
22. Stefanidou M, Alevisopoulos G, Chatziioannou A, Kouteslinis A. Assessing food additive toxicity using a cell model. Vet Hum Toxicol 2003;45(2):103-05.
23. Hur H. Cultural characteristics and log-mediated cultivation of the medicinal mushroom, *Phellinus linteus*, Mycobiol 2008; 36(2):81-7.
24. Chen H, Tian T, Miao H, Zhao YY. Traditional uses, fermentation, phytochemistry and pharmacology of *Phellinus linteus*: A review. Fitoterpia 2016;113:6-26.
25. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28(3): 350-6.
26. Albalasmeh AA, Berhe AA, Ghezzehei TA. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydr Polym 2013;97(2):253-61.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1-2):248-52.
28. Wei S, Helsper JP, Van Griensven LJ. Phenolic Compounds Present in Medicinal Mushroom Extracts Generate Reactive Oxygen Species in Human Cells In Vitro. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2008;10(1):1-13.
29. Pramanik M, Chakraborty I, Mondal S, Islam S. Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju* Carbohydr Res 2007;342(17):2670-5.
30. Samchai S, Seephokai P, Sangdee A, Puntumchai A, Klinhom U. Antioxidant, Cytotoxic and Antimalarial Activities from Crude extracts of Mushroom *Phellinus linteus*. Biol Sci 2009;9(7):778-83.
31. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The Determination of flavonoid contents in mulberly and their scavenging effect on superoxide radicals. Food Chem 1999;64(4):555-9.
32. Seephonkai P, Samchai S, Thongsom A, Sunaart S, Kiemsanmuang B, Chakuton K. DPPH radical scavenging activity and total phenolics of *Phellinus* mushroom extracts collected from northeast of Thailand, Chin. J. Nat. Med 2011;9(6):441-5.
33. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo ID. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom Phellinus linteus. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1995;43 (12):2105-08.
34. Kim GY, Park HS, Nam BH, Lee SJ, Lee JD. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. Bioresource Technology 2003;89(1):81-7.
35. Kim GY, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK et al. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006;70(5):1218-26.
36. Matsuba S, Matsuno H, Sakuma M, Komatsu Y. *Phellinus linteus* Extract Augments the Immune Response in Mitomycin C-Induced Immunodeficient Mice. Evid Based Complement Alternat Med. 2008;5(1):85-90.
37. Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper JP, Van Griensven LJ. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of

the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus, Agaricus brasiliensis, Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* Food Chem 2011;129(4):1667-75

38. Howarth C, Gleeson P, Attwell D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. J Cereb Blood Flow Metab 2012;32(7): 1222-32.
39. Erbsloh F, Bernsmeier A, Hillesheim H. The glucose consumption of the brain & its dependence on the liver. Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr 1958; 196(6):611-26.
40. Praveen K, Viswanath B, Usha KY, Pallavi H, Venkata Subba Reddy G, Naveen M, Rajasekhar Reddy B. Lignolytic Enzymes of a Mushroom Stereum ostrea Isolated from Wood Logs. Enzyme Res 2011; 2011(1):1-6.
41. Maiti S, Bhutia SK, Makkick SK, Kumar A, Khadgi N, Maiti TK. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushroom. Environ Toxicol Pharmacol 2008; 26(1):187-91.
42. Hsu HC, Hsu CI, Lin RH, Kao CL, Lin JY. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from Volvariella volvacea. Biochem J 1997;323(Pt 2): 557-65.
43. Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T. Flavoglaucin, a metabolite of Eurotium chevalieri, its antioxidation and synergism with tocopherol. J Am Oil Chem Soc 1984;61(12): 1864-8.
44. Cheung LM, Cheung PC, Ooi VE. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem 2003;81(2):249-55.
45. Lung MY, Tsai JC, Huang PC. Antioxidant Properties of Edible Basidiomycete *Phellinus igniarius* in Submerged Cultures. J Food Sci 2010;75(1):E18-24.
46. Jin GH, Lee MW, Im KH, Lee TS. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and xanthine oxidase inhibitory activities of three extracts from *Phellinus igniarius*. J mushroom 2014;12(1):1-7.
47. Ayala-Zavala JF, Silva-Espinoza BA, Cruz-Valenzuela MR, Villegas-Ochoa MA, Esqueda M, González-Aguilar GA et al. Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. From Sonora, Mexico. Rev Iberoam Micol 2012;29(3):132-8.
48. Thetarimuang C, Khammuang S, Sarnthima R. Antioxidant activity of crude polysaccharides from edible fresh and dry mushroom fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. Int J Pharm 2011;7(1):58-65.
49. อนันต์ โพธิ์ลังกา, วรวิทย์ รัตนพิเศษ, เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์. การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของฟีนอลิคกับฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากต้นเฉาก๊วยและต้นหมาน้อย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมาหาสารคาม. 2014; 33(2):224-32.
50. Rice-Evans CA, Miller NT, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science 1997;2(4):304-330.
51. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in elected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chem 1998;46(10):4113-7.
52. Shihidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 1992;32(1):67-103.
53. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidants in food: practical applications, New York: CRC Press; 2001. p.380-388.
54. Chang HY, Ho YL, Sheu MJ, Lin YH, Theng MC, Wu SH et al. Antioxidant and free radical scavenging ativities of *Phellinus merrillii* extracts, Botanical Studies 2007;48(4):407-17.