การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากดอกและเส้นใยเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.

นางสาวสิริลักษณ์ ชัยจารัส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2536

ISBN 974-583-545-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019128

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ACTIVITIES OF THE POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM FRUITING BODY AND THE MYCELIUM OF *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST.

MISS SIRILUX CHAIJUMRUS

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme Biotechnology

Graduate school

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-545-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากดอกและเส้นใยเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum*

โดย นางสาวสิริลักษณ์ ชัยจารัส

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นางพรทิพา พิชา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(นางพรทิพา พิชา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

ลิริลักษณ์ ชัยจำรัส : การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซ็คคาไรด์ที่สกัดจากดอกและเส้นใยเห็ดหมื่นปี Ganoderma lucidum (PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTITUMOR ACTIVITIES OF THE POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM FRUITING BODY AND THE MYCELIUM OF Ganoderma lucidum) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พนิชยกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นางพรทิพา พิชา, 152 หน้า. ISBN 974-583-545-5

การผลิตดอกเห็ดหมื่นปี (Ganoderma lucidum) จากการแยกเนื้อเยื่อสายพันธุ์ในประเทศให้ผลดีเมื่อเพาะในถุงขี้เลื่อยไม้ยางพารา ได้ค่า Biological efficiency 14.5% ระยะการเก็บ 90 วัน การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่เจริญในสูตรอาหาร PD (มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร และกลูโคส 60 กรัม/ลิตร), YME (กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) สูตร Molass ความเข้มข้น 5% (V/V) และกลูโคส 50 กรัม/ลิตร จะให้อัตราการเจริญและการผลิตสารโพลิแซ็คคาไรด์สูงสุด การเพิ่มธาตุอาหารในแต่ละสูตรจะทำให้การสังเคราะห์โพลิแซ็คคาไรด์ลดลง

การสกัดสารโพลิแซ็คคาไรด์จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6-B ได้สารโพลิแซ็คคาไรด์ 2 ฟีคหลัก ทั้งในเส้นใยและดอก ส่วนในอาหารเลี้ยงเส้นใยมีเพียง 1 ฟีค น้ำหนักโมเลกุลสูงสุดของสารโพลิแซ็คคาไรด์ที่แยกได้จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยคือ 1.2×10^6, 1.9×10^6 และ 1.9×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ ผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซ็คคาไรด์เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากดอกและเส้นใยโดยฉีดเข้าช่องท้อง (ให้เซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma 2×10^4 เซลล์/หนู 1 ตัว) คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารโพลิแซ็คคาไรด์โดยหาจุดหลอมเหลว, ค่า specific rotation ($|\alpha|_D^{25}$ C = 0.005, น้ำกลั่น) และน้ำหนักโมเลกุล ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเท่ากับ 1,800, 2,800 และ 3,200 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ทาง Histopathology ภายใต้กล้องไมโครสโคป

พระนครเหนือ สถาบันเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C426501 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: Ganoderma lucidum / POLYSACCHARIDES / ISOLATION
SIRILUX CHAIJUMRUS : PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTITUMOR ACTIVITIES OF THE POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM FRUITING BODY AND THE MYCELIUM OF Ganoderma lucidum. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : MRS. PORNTIPA PICHA, 152 pp. ISBN 974-583-545-5.

Production of the fruiting body of Ganoderma lucidum an importance mushroom isolated from Thailand, was achieved in para-rubber sawdust plastic bag which 14.5% biological efficiency with in 90 days. The comparative studies of mycelial growth and polysaccharides production were studied. Data indicated that cell growth and polysaccharides production were affected by the culture system used. The yields was highly dependence on the presence of mono- and di-saccharides in the medium components. Good mycelium growth was established in potato-dextrose, PD (400 g/l) potato extracted and 60 g/l glucose), while in yeast-malt extract medium, YME, 60 g/l of glucose was necessary for the optimum growth and production. The growth rate and polysaccharide yields were maximum in 5% Molass supplemented with 9% glucose. Addition of extra mineral mixture resulting in lower level of polysaccharides synthesis.

Polysaccharides extracted from the fruiting body, mycelium and cultivated medium with hot water were fractionaled and purified by ethanol precipitation, DEAE-cellulose and repeated Sepharose 6B gel-filtration. A total of two major polysaccharide peaks were obtained an fruit body and mycelium, where as only one major peak could be detected in the cultured medium extracted. The highest molecular weight peaks which were isolated from fruit body, mycelium and cultivated medium (1.3×10^6, 1.9×10^6 and 1.9×10^6 dalton) were screened for the antitumor activity. They were all exhibited a relatively activities in comparison to the crude extracted from both fruiting and mycelium (The Fibrosarcoma 100 mg/mice, i.p. method). Some physical and chemical proporties of the purified polysaccharides were determin determined, those included, melting point, specific rotation ($|\alpha|_D^{25}$ C = 0.005, H_2O), and molecular weight. The toxicity of were observed at 1,800, 2,800 and 3,200 mg/kg BW. injected mice for the crude polysaccharides extracted from fruit body, mycelium and extracellular respectively. There was no alteration in histopathological characteristics of the mouse Fibrosarcoma tumor when investigated under the microscope.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คุณพรทิพา พิชา เป็นอย่างสูงที่ให้ทั้งความรู้ คำแนะนำและความคิด ในการดำเนินการวิจัยตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้อำนวยการสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่อนุมัติให้ดำเนินโครงการวิจัยนี้ ได้ใช้ห้องปฏิบัติการของงานวิจัยสารบัดมะเร็ง

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่ได้กรุณาเป็นประธานและกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์

กราบขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัยนี้

และรองศาสตราจารย์ สุทธพรรณ ตรีรัตน์ ผู้ซึ่งมีส่วนริเริ่มงานวิจัยนี้ ขอกราบขอบพระคุณ และขอให้อาจารย์มีกำลังใจและพลานามัยที่ดี

ขอบพระคุณอาจารย์ ปัญญา เต็มเจริญ ที่ช่วยกรุณาตรวจสอบทาง Histopathology

ขอบพระคุณ คุณมติ เหรียญกิจการ และสัตวแพทย์หญิง เพียงใจ ดูประดินันท์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนความสะดวกในการทำงานวิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือของเพื่อน ๆ

และขอขอบคุณ โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ (U.D.C.) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้

สารบัญ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 15

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ 15

2.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์ 18

2.3 วิธีการทดลอง 20

2.3.1 การผลิตเส้นใยและดอกเห็ดหมื่นปี 20

2.3.1.1 การเพาะดอกเห็ดในถุงขี้เลื่อย 20

2.3.1.1.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด (grain spawn) 20

2.3.1.1.2 วิธีการเพาะและการบรรจุถุง 20

2.3.1.2 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว 21

2.3.1.2.1 เตรียมเชื้อเห็ด (inoculum) 21

2.3.1.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดเลือก

อาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเส้นใย 21

หน้า

2.3.2 การสกัดแยกสารจากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) 25

2.3.2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเส้นใยและดอกเห็ด.. 25

2.3.2.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจากอาหารเลี้ยงเส้นใย.. 25

2.3.2.3 การแยกสารประกอบโพลิแซคคาไรด์จากสารสกัดหยาบ... 26

2.3.2.2.1 การเตรียมคอลัมน์ DEAE-cellulos 26

2.3.2.2.2 การเตรียมคอลัมน์ Sepharose 6B 26

Sepharose 4B 27

Sephadex G-75 27

Sephadex G-200 27

2.3.2.2.3 การหาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Anthrone 27

2.3.2.2.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method... 29

2.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์. 29

2.3.3.1 การหาจุดหลอมเหลวโดยวิธี Oil bath..... 29

2.3.3.2 การหา specific rotation..... 29

2.3.3.3 การหามวลโมเลกุล..... 30

2.3.4 วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง 30

ทางชีวภาพ 30

2.3.4.1 การทดสอบในหนู C3H 30

2.3.4.2 การทดสอบในหนู nude mice..... 30

2.3.4.3 การเตรียมสารออกฤทธิ์สำหรับฉีดให้หนูทดลอง..... 37

2.3.4.4 การให้สารออกฤทธิ์แก่หนูทดลอง 38

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดหมื่นปี 41

2.5 การตรวจสอบทาง histophatology 41

หน้า

3. ผลการทดลอง 42

3.1 การเจริญและผลผลิตของเส้นใยกับดอกเห็ดหมื่นปี..... 42

3.1.1 การเพาะเส้นใยเห็ดหมื่นปีเพื่อผลิตดอกเห็ดในถุงขี้เลื่อย..... 42

3.1.2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยและผลผลิตเส้นใยเห็ดหมื่นปี 44

3.2 การศึกษาผลผลิตและคุณลักษณะของสารต่อต้านมะเร็งที่สกัดได้จากเห็ดหมื่นปี 60

3.2.1 การสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปีด้วยน้ำร้อน 60

3.2.2 การสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเอทธานอล..... 75

3.2.3 การทำให้สารต่อต้านมะเร็งบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส 75

3.2.4 การทำให้สารต่อต้านมะเร็งบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ เซฟาโรส-6บี 78

3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ 92

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง..... 92

3.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของหนูทดลองในขณะได้รับการปลูกถ่ายเชื้อเซลล์มะเร็ง..... 107

3.6 ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี..... 107

3.7 ผลของการตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง histophatology..... 111

4. วิจารณ์ผลการทดลอง..... 113

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 126

บรรณานุกรม..... 128

ภาคผนวก..... 136

ประวัติผู้เขียน..... 152

สารบัญตาราง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ หน้า

1 จำนวนการตายของประชากรไทยด้วยสาเหตุที่สำคัญและอัตรา (ต่อประชากรแสนคน) พ.ศ.2530 10

2 มะเร็งที่พบมาก 10 อันดับแรกในปีพ.ศ.2534 11

3 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของดอกเห็ดสดต่อถุงวัสดุเพาะ 1 กิโลกรัม 42

4 ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PD 63

5 ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YME โดยแปรผันชนิดของน้ำตาล 65

6 ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YME โดยแปรผันชนิดและปริมาณสารอาหาร 67

7 ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่สกัดด้วยน้ำร้อน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Molassโดยแปรผันชนิดและปริมาณสารอาหาร 70

8 เปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่สกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ... 76

9 เปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่สกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6B โดยใช้สารตั้งต้น 100 กรัม 88

หน้า

10 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*..... 89

11 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*..... 90

12 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*..... 91

13 คุณสมบัติทางกายภาพของสารโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6B..... 93

14 เปรียบเทียบการยืดอายุของหนู C3H ที่ถูกฉีดเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma บริเวณกล้ามเนื้อขา(intramuscular) โดยใช้จำนวนเซลล์ต่าง ๆกัน..... 95

15 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่แยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล จากเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่ฉีดเข้าช่องท้องหนู (intraperitoneal) C3H วันเว้นวัน..... 98

16 ผลการออกฤทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์ ที่สกัดแยกด้วยน้ำ และตกตะกอนด้วยเอทธานอล จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ต่อมะเร็งชนิด Fibrosarcoma 0.3 %(w/v)..... 99

17 เปรียบเทียบการเจริญของขนาดก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma 101

18 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ (%T/C)ของการเจริญของก้อนมะเร็ง..... 103

19 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนู C3H..... 105

20 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* 108

21 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*..... 109

22 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*.... 110

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ดอกเห็ด *G. lucidum* ที่เกิดในธรรมชาติ.....	2
2	ลักษณะของสปอร์เห็ด *G. lucidum*	3
3	วงชีพของเห็ดใน Class Basidiomycetes.....	4
4	โครงสร้างสารประกอบ glucan ที่พบใน เห็ด *G. lucidum*	8
5	แสดงการเตรียมสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ด *G. lucidum*	28
6	ห้องเลี้ยงหนูสีน้ำตาล C3H (Housing system) สถาบันมะเร็งแห่งชาติ.....	31
7	ลักษณะของหนูสีน้ำตาล C3H	31
8	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma ในหนู C3H	32
9	ลักษณะพ่อพันธุ์ที่เป็นหนูไร้ขน (nu,nu) และแม่พันธุ์ที่เป็นหนูขาว (+,nu) อายุ 2 เดือน.....	36
10	วิธีทำเครื่องหมายประจำตัวหนูทดลอง โดยการเจาะที่ใบหู.....	36
11	การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB cell ในตู้ CO_2 incubator.....	37
12	การฉีด KB cell ใต้ผิวหนังของหนูไร้ขน (subcutaneuos).....	37
13	ลักษณะดอกเห็ด *G. lucidum* ที่เพาะในถุงวัสดุเพาะ 1 กิโลกรัม อายุ 30-45 วัน	43
14	เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD (ใช้มันฝรั่ง 20%) โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 2, 4 และ6%.....	46
15	เปรียบเทียบอัตราการเจริญ ของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD (ใช้กลูโคส 2 %) ที่มีปริมาณมันฝรั่ง 20% และ 40%.....	46
16	เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD (ใช้กลูโคส 2 %) โดยแปรผันปริมาณมันฝรั่ง 20, 40 และ60%	47

หน้า

17 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD (ใช้มันฝรั่ง 40%) โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 2%, 4% และ6%..... 47

18 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD โดยใช้กลูโคส 2% และมันฝรั่ง 20% ระหว่างกลุ่มที่ใส่แร่ธาตุกับไม่ใส่..... 48

19 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM (ใช้น้ำตาล 2%) ชนิดต่าง ๆคือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส 48

20 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM โดยแปรผันปริมาณกลูโคสคือ 2%, 4%, 6%, 10% และ15%..... 49

21 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ที่ไม่ใส่ malt extract โดยแปรผันปริมาณ yeast extract คือ 0.3, 0.6 และ 1.0%..... 49

22 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM โดยใช้กลูโคส 6% และเติม แคลเซียมซัลเฟต 0.05% กับกลุ่มที่ไม่เติม..... 50

23 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM (ใช้กลูโคส 2%) โดยแปรผันปริมาณ แมกเนเซียมซัลเฟต คือ 0.05, 0.1 และ0.2%..... 50

24 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้น (v/v) คือ 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5, 7.5 และ 10% 51

25 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5%(v/v) โดยแปรผันปริมาณกลูโคสคือ 0 , 2, 4 และ6%..... 51

26 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5%(v/v) โดยใช้กลูโคส 6% ระหว่างกลุ่มที่เพิ่มแร่ธาตุ กับกลุ่มที่ ไม่เพิ่มแร่ธาตุ 52

27 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 1%(v/v) โดยใช้กลูโคส 6% ระหว่างกลุ่มที่เพิ่มแร่ธาตุ กับกลุ่มที่ ไม่เพิ่มแร่ธาตุ 52

หน้า

28 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5 %(v/v) โดยแปรผันปัจจัยที่เติมลงในอาหาร..... 54

29 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD, YM (ใช้กลูโคส 2%) และ Molass 5%(v/v)..... 54

30 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD, YM (ใช้กลูโคส 2%) และ Molass 5%(v/v)..... 55

31 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ..... 55

32 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM (ใช้กลูโคส 2%) โดยแปรผันขนาด pH ต่าง ๆกันคือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ7.0..... 56

33 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM (ใช้กลูโคส 2%) เมื่อเลี้ยงในที่มีอุณหภูมิ 24-26 ^{o}ซ กับ 28-32 ^{o}ซ..... 56

34 ลักษณะของเส้นใยเห็ด *G. lucidum* บนอาหารเหลวชนิดต่างๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{o}ซ) อายุ 45 วัน..... 57

35 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเหลวสูตร PD และ PD เติมแร่ธาตุที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(28-32 ^{o}ซ)..... 58

36 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเหลวสูตร YM และ YM เติม$CaSO_4$ 0.05% ที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(28-32 ^{o}ซ) 58

37 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเหลวสูตร Molass 5% (v/v)และ Molass 5%(v/v) เติมแร่ธาตุที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(28-32 ^{o}ซ)..... 59

38 รูปแบบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่ระยะต่าง ๆ ในการเจริญเติบโตของเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM โดยใช้กลูโคส 2% 62

หน้า

39 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร PD และ YM ที่แปรผันปริมาณกลูโคส และฝรั่ง..... 64

40 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร YM ที่แปรผันชนิดน้ำตาลคือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโคส ใช้ปริมาณ 2%..... 66

41 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆคือ PD, YM และ YM+$CaSO_4$ 68

42 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร YME ดัดแปลงไม่ใส่มอลท์สกัด ใช้กลูโคส 4% โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัดคือ 0.3, 0.6 และ1.0 %..... 69

43 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลว Molass 5%(v/v) ที่แปรผันปริมาณกลูโคสคือ 0%,2%, 4% และ6% 71

44 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลว Molass 5%(v/v) โดยเติมสารอาหารต่าง ๆ..... 72

45 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลว Molass..... 73

46 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ..... 74

47 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose..... 77

48 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้จากฟีคที่ 1 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B..... 79

49 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก และ เส้นใยเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 2 ไปผ่านคอลัมม์ Sepharose 6B 80

50 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก และ เส้นใยเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 1 และ 2 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B รวมสารที่แยกได้คือ FI-1 กับ FII-1 ในดอกและ MI-1 และ MII-1 ในเส้นใยไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง..... 81

51 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก ของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 1ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B และนำสารที่แยกได้คือฟีค FI-1, FI-2 และFI-3 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง..... 83

52 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก ของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 2ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B และนำสารที่แยกได้คือฟีค FII-1, FII-2 และFII-3 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง..... 84

53 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 1ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B และนำสารที่แยกได้คือฟีค MI-1, MI-2 และMI-3 ไปผ่านคอลัมม์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง..... 85

54 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 2ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B และนำสารที่แยกได้คือฟีค MII-1, MII-2 และMII-3 ไปผ่านคอ

หน้า

ลัมน์ Sepharose 6B เติมอีกครั้งหนึ่ง..... 86

55 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากอาหารเลี้ยงเส้นใย ของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้ฟีคที่ 1ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B และนำสารที่แยกได้คือฟีค EI-1, EI-2 และ EI-3 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เติมอีกครั้งหนึ่ง..... 87

56 แสดงมวลโมเลกุลของสารโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี *G.lucidum* 94

57 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma กับอายุ Mean Survival Timeของหนู C3H ที่ถูกฉีดเซลล์มะเร็ง บริเวณกล้ามเนื้อขา (intramuscle) จำนวนเซลล์ต่าง ๆกัน..... 96

58 เปรียบเทียบการเจริญของก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma ในหนู C3H..... 100

59 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ (%T/C) ของการเจริญของก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma 102

60 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนู C3H ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ในกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง..... 104

61 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* 108

62 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*..... 109

63 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*... 110

64 ลักษณะเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ที่ได้จากหนู C3H..... 112

65 ลักษณะเซลล์ปอดของหนู C3H ที่ตรวจพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma..... 112