บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเจริญและผลผลิตของเส้นใยกับดอกเห็ดหมื่นปี

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปีเพื่อผลิตดอกเห็ดในถุงขี้เลื่อย

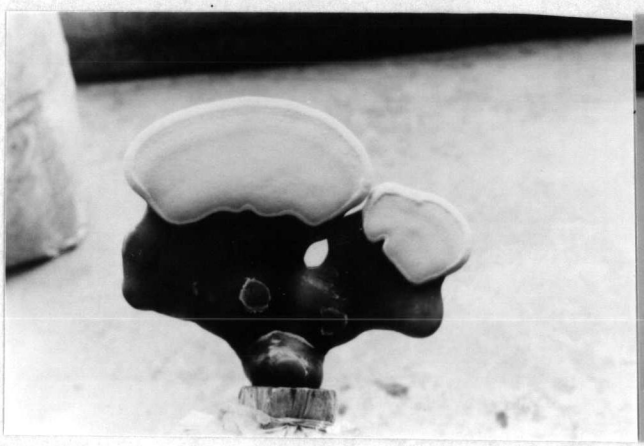
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดในวัสดุขี้เลื่อยไม้ยางพาราขนาดบรรจุถุง 1 กิโลกรัม (วิธีข้อ2.3.1.2.2) พบว่าเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตเต็มถุงวัสดุเพาะภายใน 15 วัน จะได้เส้นใยที่เจริญเติบโตเต็มที่ คือเส้นใยจะมีสีขาวเข้มบางส่วน เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะเส้นใยหนาขึ้นบางส่วนรวมตัวกันคล้ายแผ่นหนัง จากนั้นจึงทำการเปิดดอก เมื่อให้ความชื้นโดยการฉีดน้ำเป็นละอองเช้า-เย็น ในโรงเพาะธรรมชาติ(อุณหภูมิ 28-34 ^{o}ซ) ประมาณ 5-7 วัน เส้นใยจะเริ่มสร้างตุ่มเห็ด (primodia) และใช้เวลาอีก 25-30 วัน จึงจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยสังเกตุจากผิวดอกเห็ดด้านบนมีสีน้ำตาลแดงสม่ำเสมอทั่วทั้งดอก และมีการสร้างสปอร์ออกมา (รูปที่ 13) จึงเก็บดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ รอบแรกได้ภายใน 28 วัน รอบที่ 2,3 หลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 46 และ 96 วัน ตามลำดับ เพื่อนำไปใช้สกัดสารต้านมะเร็งต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของดอกเห็ดสดต่อถุงวัสดุเพาะ 1 กก.

รอบที่	จำนวนตัวอย่าง (ถุง)	น้ำหนักสดเฉลี่ย (กรัม)	ความชื้นของดอก (%)	ค่า Biological efficiency (B.E.)(%)
1	180	37.8±3.2	67.1	7.6
2	109	16.4±5.7	54.7	4.5
3	47	9.4±7.8	41.3	2.4

พลอมุกดาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(A)



(B)

รูปที่ 13 ลักษณะดอกเห็ด *G. lucidum* เพาะในถุงวัสดุเพาะ 1 กิโลกรัม อายุ 30-45 วัน

A โรงเพาะเห็ดธรรมชาติ ภาควิชาชีวเคมี

B ลักษณะผิวด้านบนและด้านล่างของดอกเห็ด

3.1.2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยและผลผลิตเส้นใยเห็ดหมื่นปี

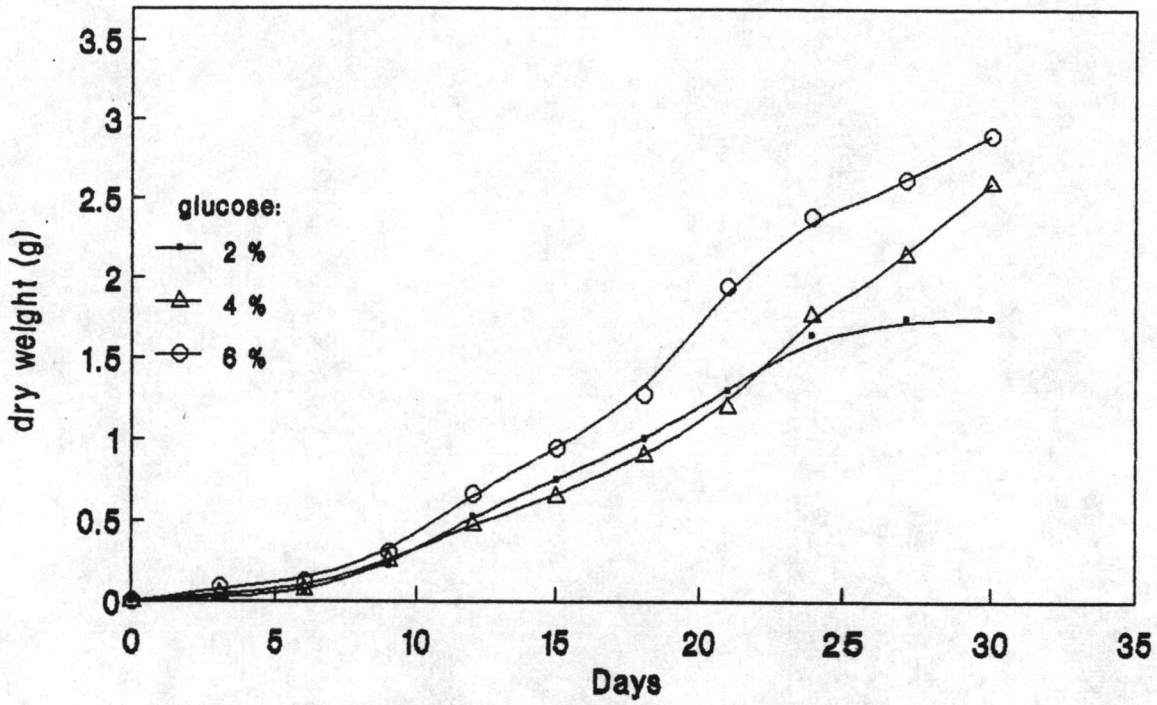
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยในสภาพนิ่ง (stationary culture) บนอาหารเหลวปริมาณ 200 มล.ในขวดทดลองขนาด 500 มล. เพื่อศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย โดยใช้อาหารเหลวสูตร PD, YME และ Molass (ภาคผนวก 1) ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5±0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-34 ^{o}ซ)ในสภาพที่มีแสงวันละ 12 ชั่วโมง ผลของการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใย ตลอดระยะการเจริญเติบโต 45 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยเห็ด ที่เลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร PD จะแปรตามปริมาณกลูโคสสูงสุดที่ 60 กรัม/ลิตร (รูปที่ 14)เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ด แล้วพบว่าการเพิ่มปริมาณมันฝรั่ง จะช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตในระยะเร่ง (log phase) สูงขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 15) แต่ทั้งนี้ย่อมขึ้นกับปริมาณกลูโคสเป็นสำคัญ เพราะถ้าให้กลูโคสน้อยเกินไป การเพิ่มปริมาณมันฝรั่งก็ไม่ช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้น (รูปที่ 16) ฉะนั้นจึงใช้มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร และปริมาณกลูโคสสูงสุดที่เส้นใยจะเจริญได้คือ 60 กรัม/ลิตร (รูปที่ 17) นอกจากนี้การเพิ่มแร่ธาตุลงในสูตรอาหาร PD มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดเล็กน้อย (รูปที่ 18) ฉะนั้นในอาหารเหลวสูตร PD จะให้น้ำหนักเฉลี่ยเส้นใยแห้งสูงสุดเมื่อใช้มันฝรั่ง 40 กรัม/ลิตร และกลูโคส 60 กรัม/ลิตร ประมาณ 3.28 กรัม

การศึกษาชนิดของน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร YME ได้แก่ กลูโคส, ฟรุกโตส และ ซูโครส พบว่าน้ำตาลกลูโคสจะให้ค่ามวลสูงสุด เมื่อสิ้นสุดการเจริญเติบโตอายุ 30 วัน จะใกล้เคียงกับฟรุคโตส แต่มากกว่าซูโครส ประมาณ 1.5 เท่า ซูโครสจะเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 15 ฟรุคโตส และ กลูโคส วันที่ 20 และ 25 ตามลำดับ แต่น้ำตาลฟรุกโตส จะช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตในระยะเร่งสูงสุด (รูปที่ 19) จากการแปรผันปริมาณกลูโคสที่ใช้ พบว่ามีขีดจำกัด สำหรับความต้องการ ในการเจริญของเส้นใยเห็ด กลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะมีการเจริญเติบโตสูงสุด ถ้าให้มากกว่านี้การเจริญเติบโตจะลดลง (รูปที่ 20) การเพิ่มมอลท์สกัด ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้การเจริญเติบโตสูงขึ้นด้วย จาก

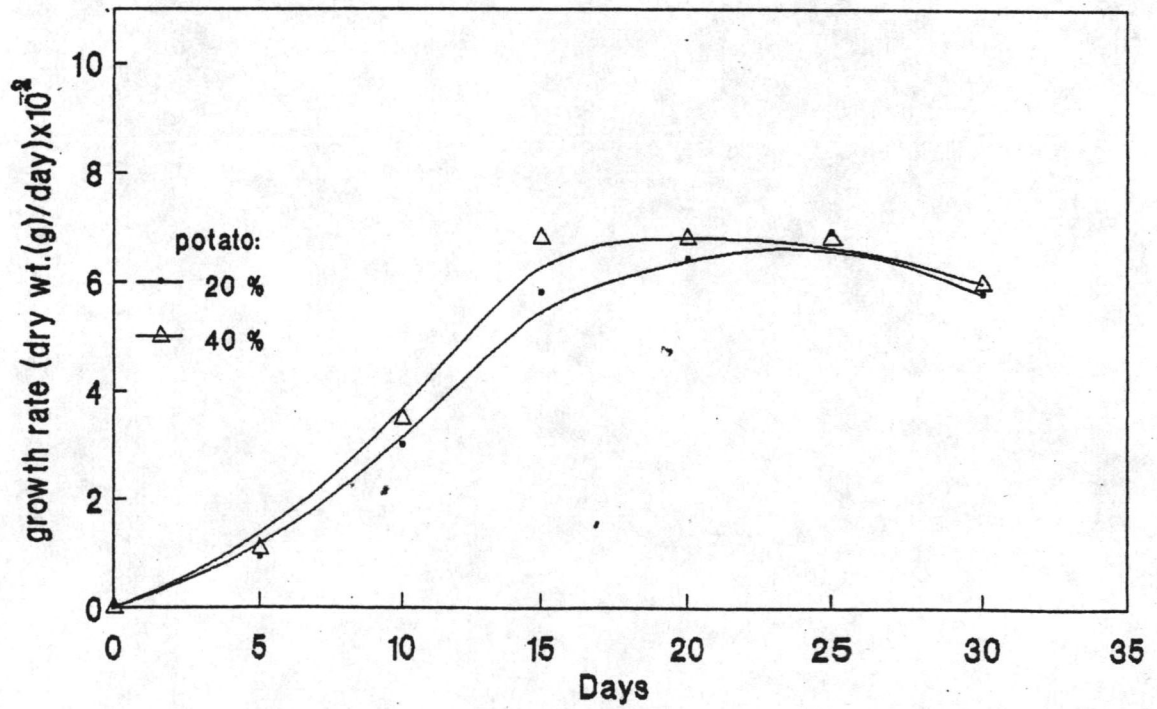
กราฟ รูปที่ 21 จะเห็นว่าการใช้มอลท์สกัด 1 กรัม/ลิตร จะให้การเจริญเติบโตสูงสุด แต่การเพิ่มธาตุอาหารแคลเซียมซัลเฟต ลงในสูตรอาหาร YME ไม่ได้ช่วยให้การเจริญเติบโตสูงขึ้นแต่อย่างใด (รูปที่ 22) และการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารแมกนีเซียมซัลเฟต ที่มีอยู่ในสูตรอาหาร YME 0.05 ,0.1 และ 0.2 % (w/v) ก็ไม่ทำให้การเจริญเติบโตแตกต่างกัน (รูปที่ 23)

นอกจากการศึกษาสูตรอาหารมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ได้มีการศึกษาแหล่งคาร์บอนทดแทนเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิต ในที่นี้ได้เลือกใช้กากน้ำตาล (ภาคผนวกที่ 1) โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นเป็น %(v/v) พบว่าขีดจำกัดของการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของ Molass ที่ใช้ในการผลิตไม่ควรเกิน 7.5 %(v/v) (รูปที่ 24) ซึ่งจะให้การเจริญเติบโตใกล้เคียงกับ ความเข้มข้น 5 %(v/v) เราจึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาต่อไป โดยแปรผันปริมาณกลูโคส และการเพิ่มสารอาหารบางชนิด จากการทดลองพบว่า สูตรอาหารโมลาสความเข้มข้น 5 %(v/v) จะให้การเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้กลูโคส 60 กรัม/ลิตร (รูปที่ 25) ลองเติมแร่ธาตุในสูตรอาหารมาตรฐาน YME อีกก็ไม่ช่วยให้การเจริญเติบโตดีขึ้นกว่าเดิม (รูปที่ 26) ถึงแม้ว่าจะลดความเข้มข้นของโมลาสลงเป็น 1%(v/v) ก็ตามการเพิ่มธาตุอาหารก็ไม่ช่วยให้การเจริญเติบโตสูงขึ้นแต่อย่างใด (รูปที่ 27) โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ จากการวิเคราะห์พบว่า มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง แต่มีแหล่งไนโตรเจนน้อย จึงทดลองเติมยีสต์สกัดในสูตรอาหารโมลาสความเข้มข้น 5%(v/v) เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารโดยใช้ยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ทำให้เส้นใยในสูตรอาหาร YME ดัดแปลงไม่ใส่มอลท์สกัดเจริญดีที่สุด ในสูตรอาหาร Molass ก็เช่นกัน ยีสต์สกัดทำให้อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยดีขึ้นกว่าเดิมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 28)

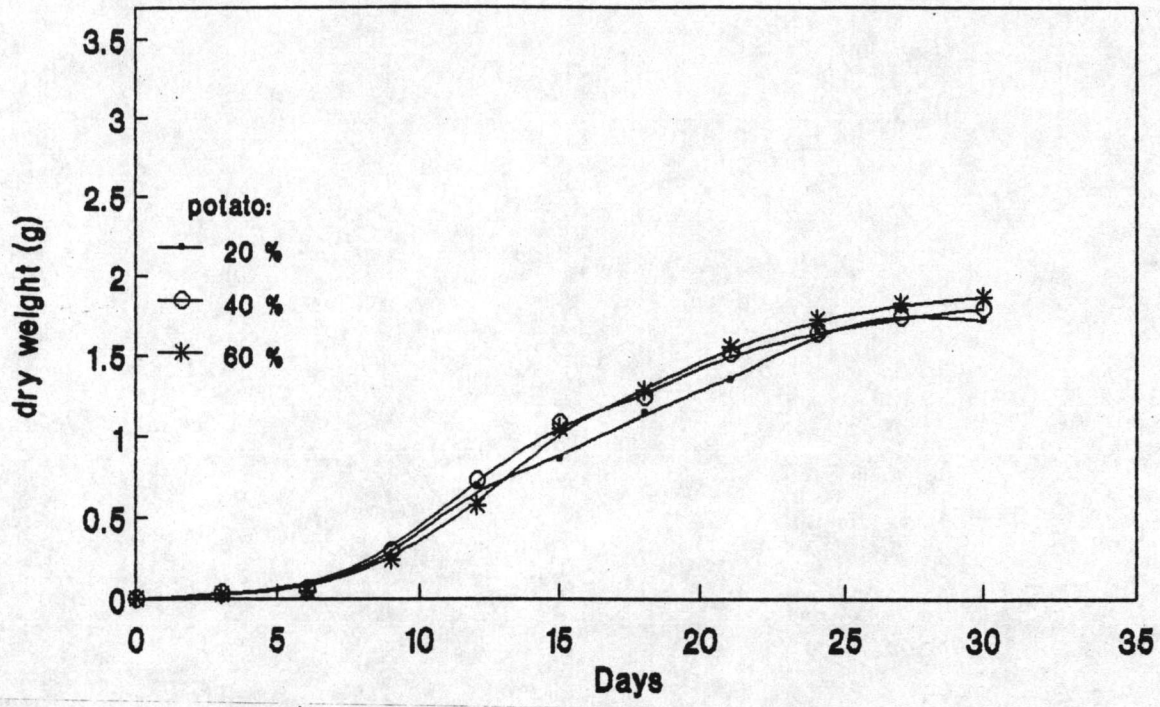
การเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ในอาหารเหลวสูตร PD และ YME ที่ใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร ในปริมาณที่เท่ากัน เปรียบเทียบกับสูตรอาหารMolass ความเข้มข้น 5%(v/v) จากการวิเคราะห์ (ภาคผนวกที่ 12) พบว่ามีปริมาณน้ำตาลซูโครส 2.8 กรัม และ น้ำตาลรีดิวซ์ 1.51 กรัม ในสูตรอาหาร Molass นี้จะให้การเจริญเติบโตในระยะเร่งช่วงวันที่ 10-18 สูงกว่าในสูตรอาหารมาตราฐานทั้ง 2 สูตร ข้างต้น แต่จะเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่เร็วกว่า



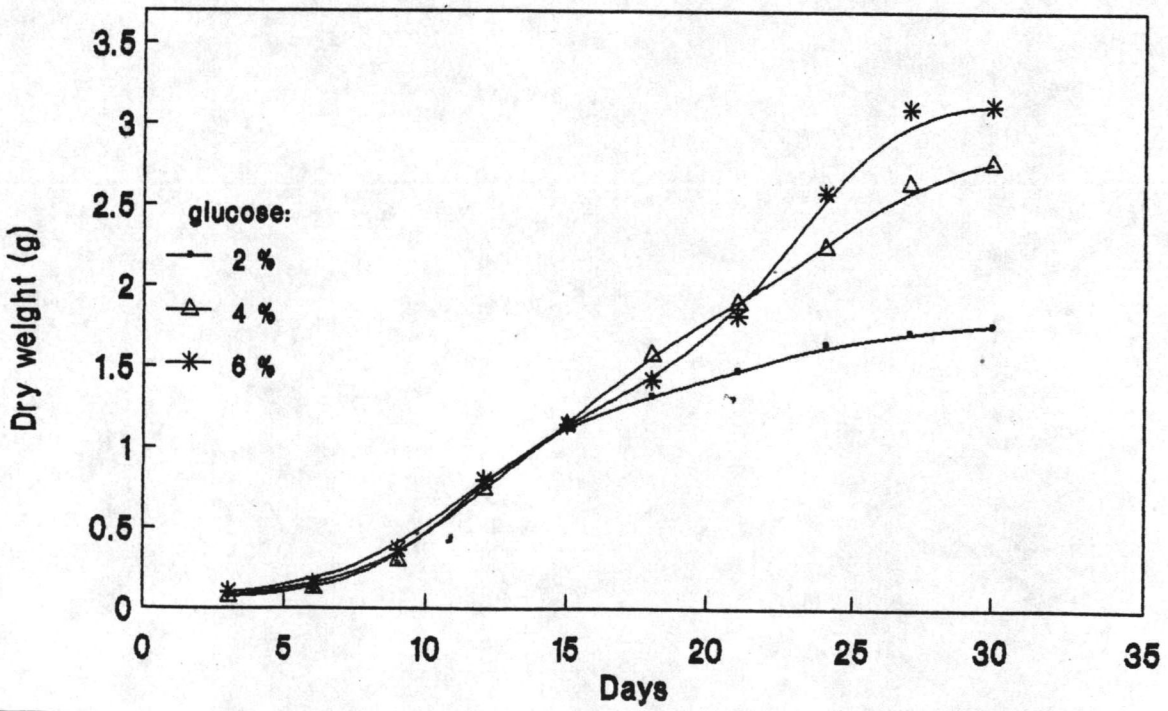
รูปที่ 14 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD ใช้มันฝรั่ง 20 % โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 2 , 4 และ6 %



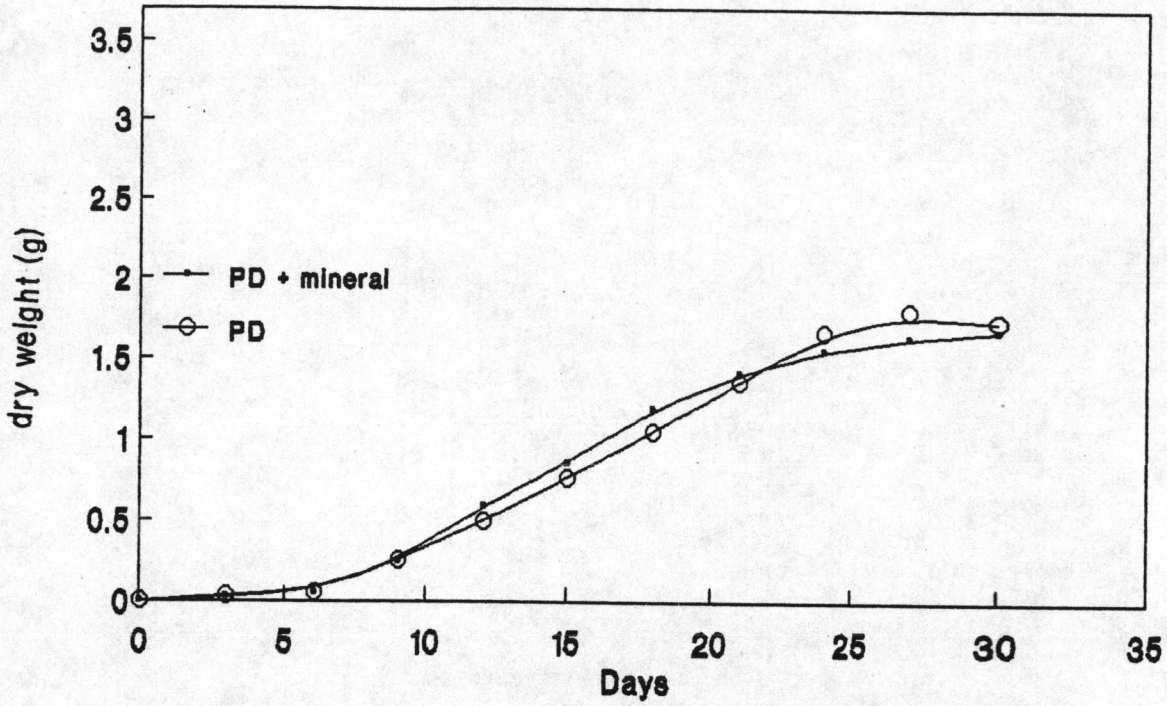
รูปที่ 15 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD ใช้กลูโคส 2 % ที่มีปริมาณมันฝรั่ง 20 % และ 40 %



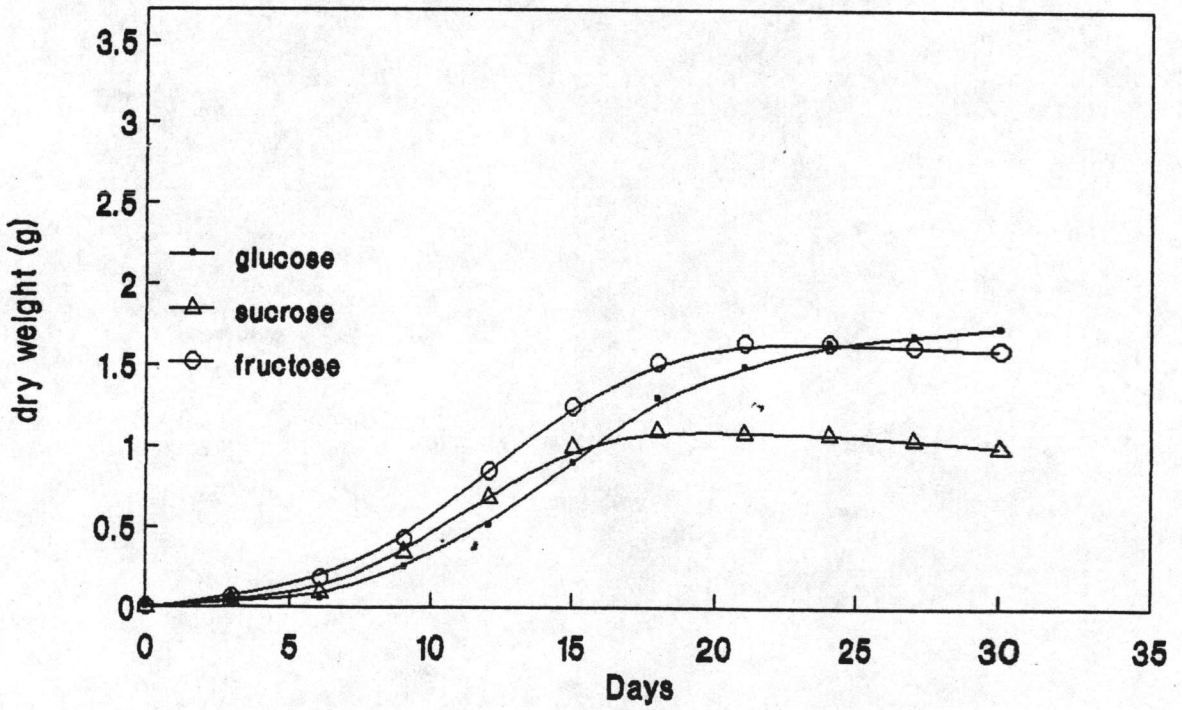
รูปที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD ใช้กลูโคส 2 % โดยแปรผันปริมาณมันฝรั่ง 20 , 40 และ60 %



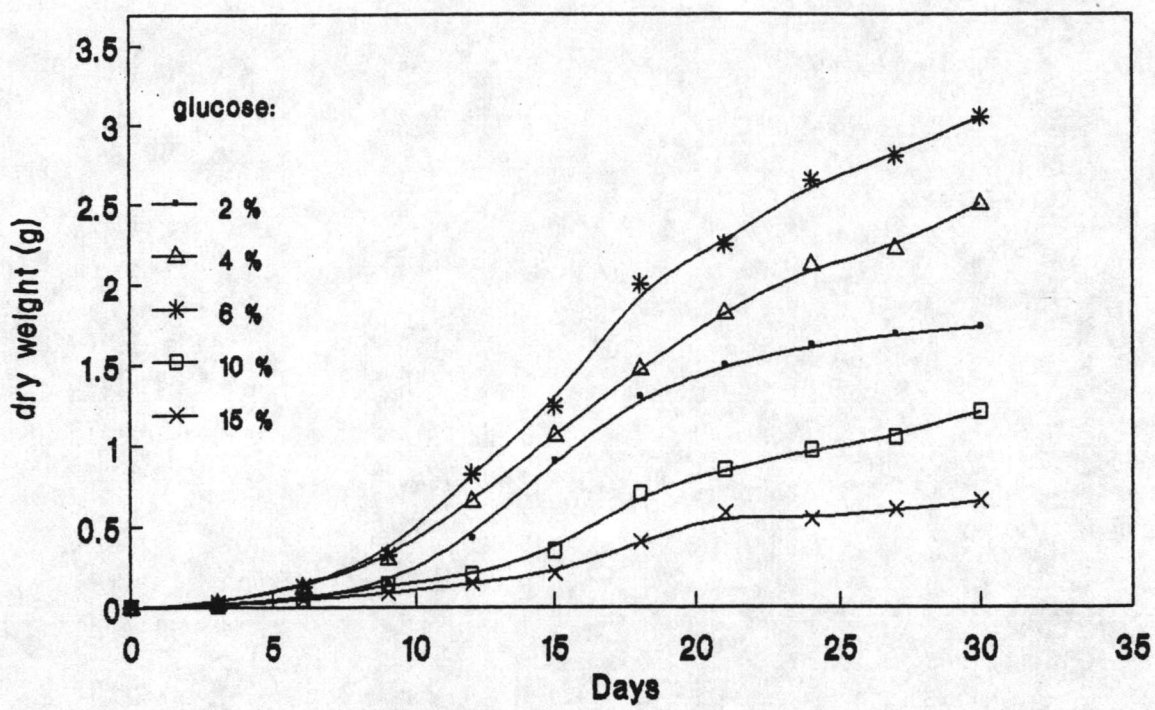
รูปที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD ใช้มันฝรั่ง 40 % โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 2 , 4 และ6 %



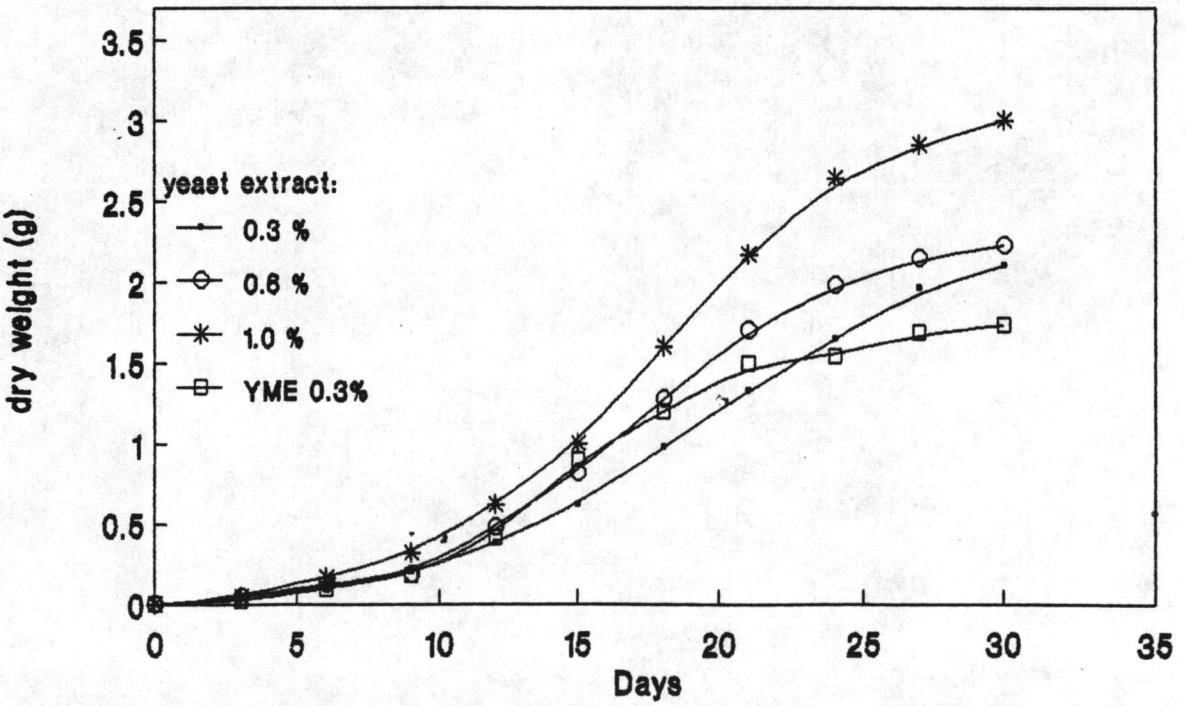
รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD (กลูโคส 2 % และมันฝรั่ง 20 %) ระหว่างกลุ่มที่ใส่แร่ธาตุ กับไม่ใส่



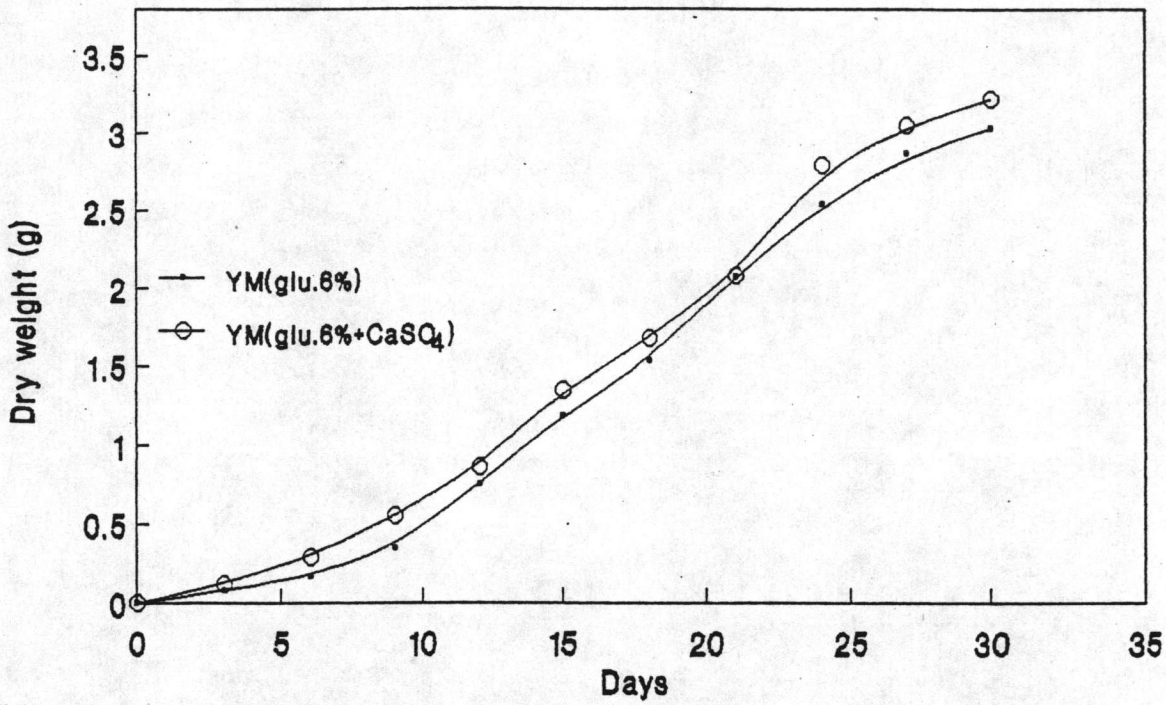
รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ใช้น้ำตาล 2 % ชนิดต่างๆ คือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส



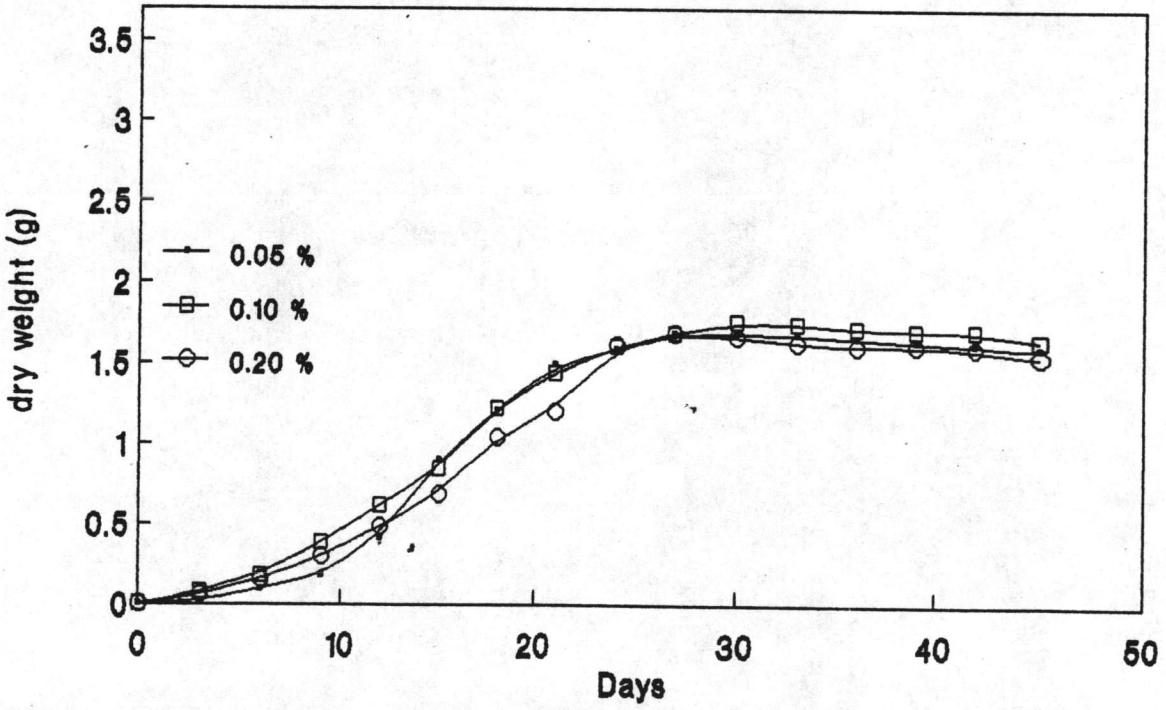
รูปที่ 20 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 2 , 4 , 6 , 10 และ15 %



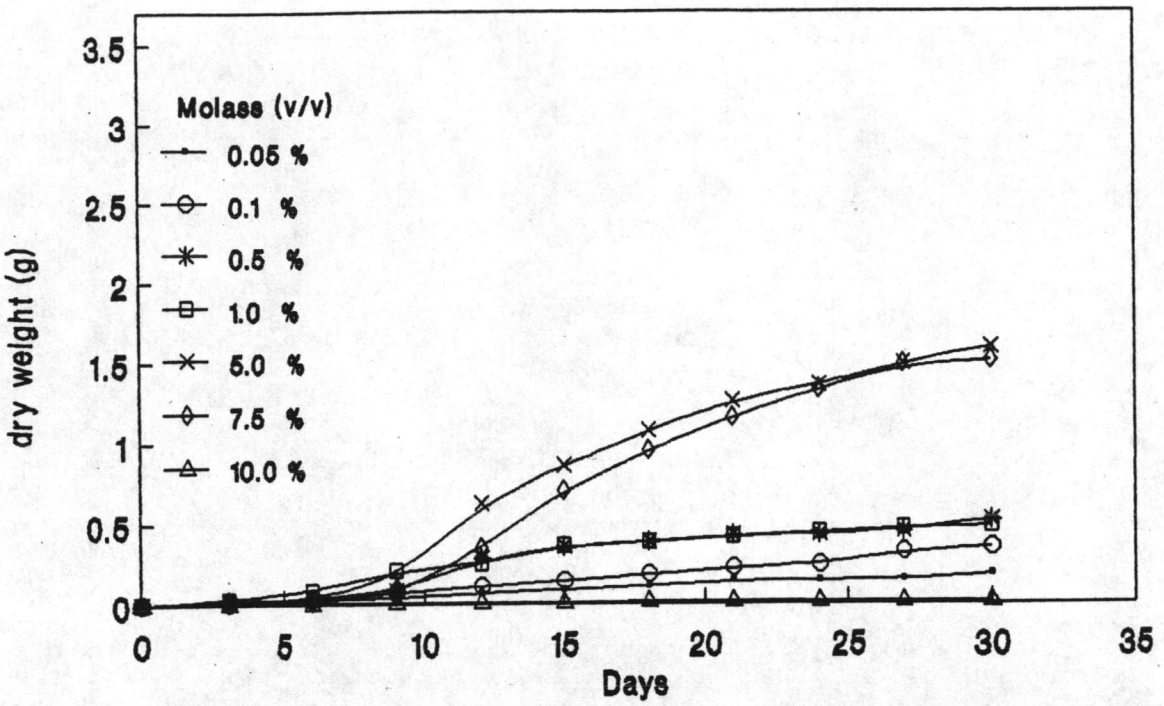
รูปที่ 21 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ที่ไม่ใส่ malt extract โดยแปรผันปริมาณ yeast extract คือ 0.3 , 0.6 และ1.0 %



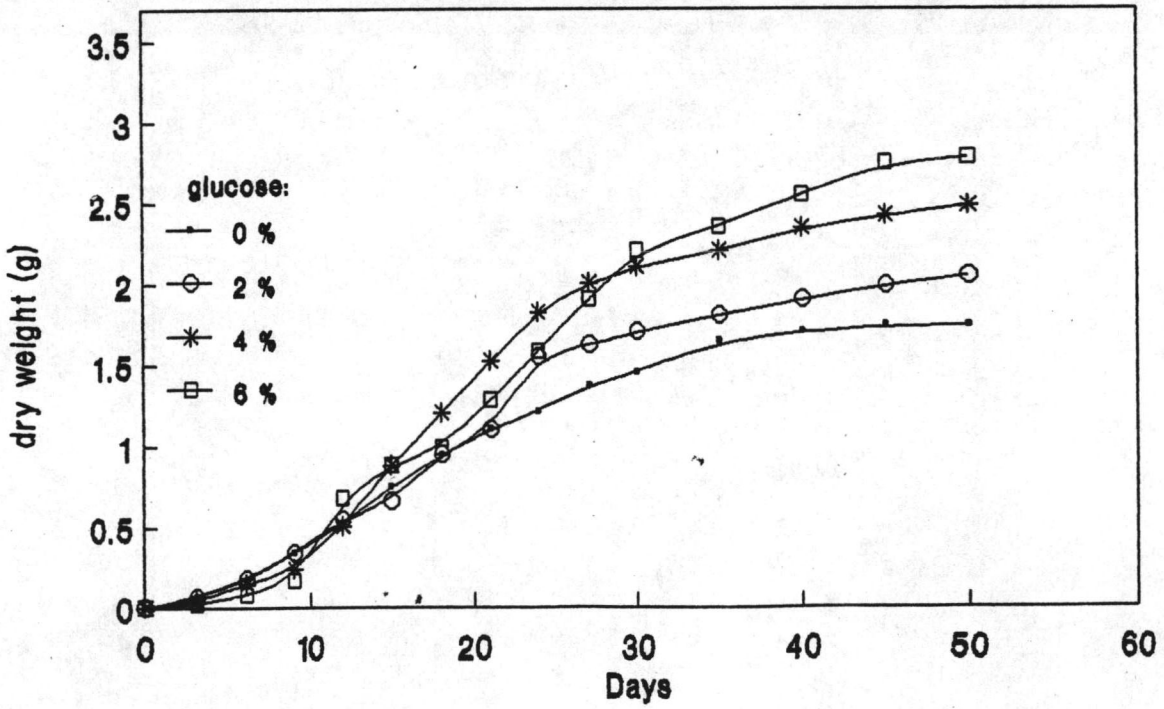
รูปที่ 22 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM โดยใช้กลูโคส 6 % และเติม แคลเซียมซัลเฟต 0.05 % เปรียบเทียบกับที่ไม่เติมแคลเซียมซัลเฟต



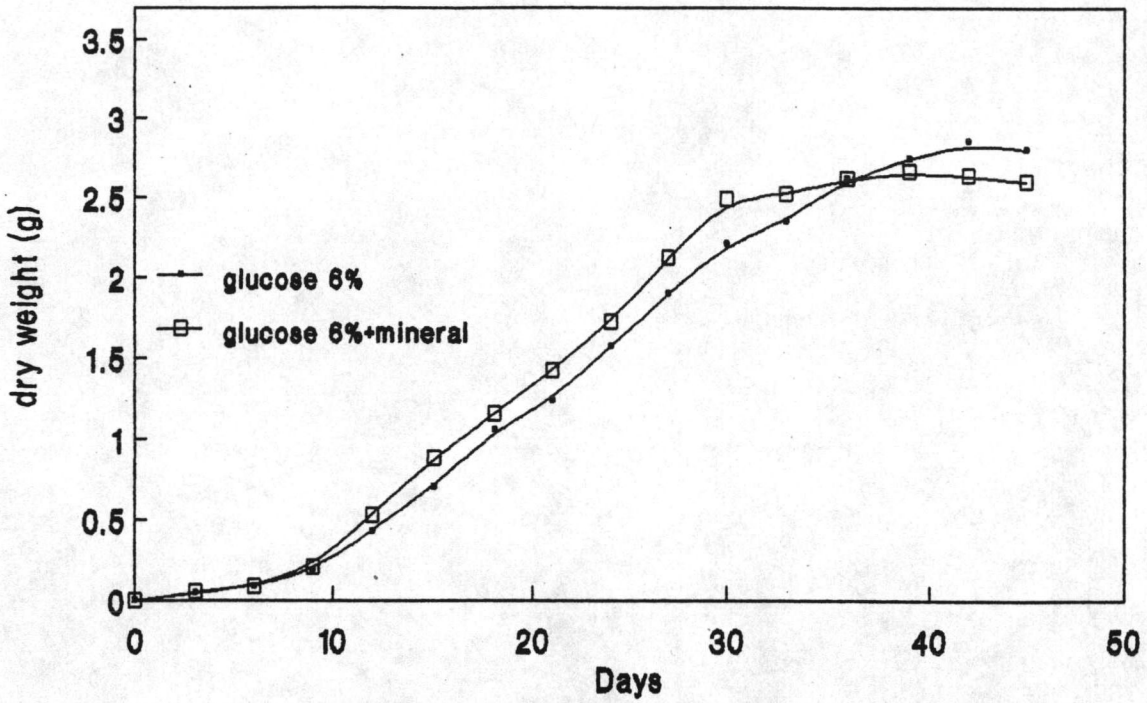
รูปที่ 23 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ใช้กลูโคส 2 % โดยแปรผันปริมาณ แมกนีเซียมซัลเฟต คือ 0.05 %, 0.1 % และ0.2 %



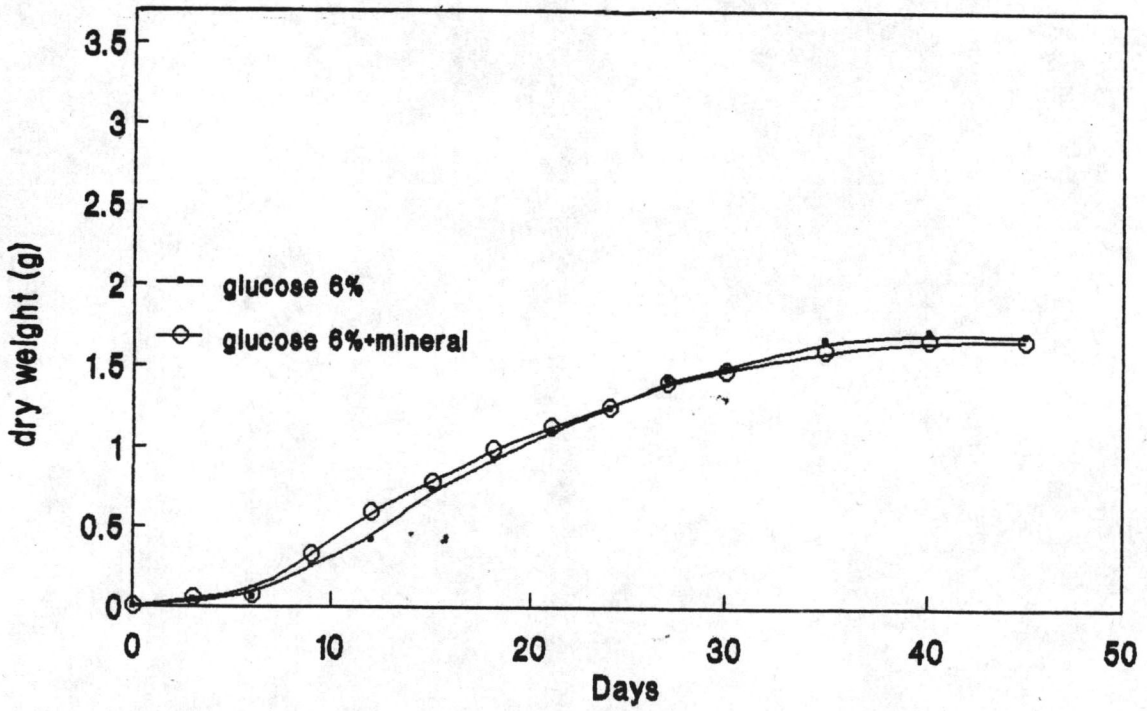
รูปที่ 24 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้น (v/v) คือ 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 7.5 และ10 %



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



รูปที่ 26 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5 % (v/v) ใช้กลูโคส 6 % ระหว่างกลุ่มที่ใส่แร่ธาตุ กับไม่ใส่



รูปที่ 27 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 1%(v/v) เพิ่มกลูโคส 6% ระหว่างกลุ่มที่ใส่แร่ธาตุกับไม่ใส่

(รูปที่ 29) คือจะเริ่มคงที่ในวันที่ 20 ส่วนสูตรอาหาร YME และ PD การเจริญจะคงที่เมื่ออายุ 25 วัน และอัตราการเจริญสูงสุดจะอยู่ในช่วงอายุ 10-18 วัน(รูปที่ 30) เมื่อเจริญสูงสุดแล้วทั้ง 3 สูตรจะให้ค่ามวลเฉลี่ยของเส้นใยแห้งใกล้เคียงกัน ผลผลิตเส้นใยแห้งสูงสุดในอาหารเหลว 3 สูตร คือ PD (มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร และกลูโคส 60 กรัม/ลิตร) YME(กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) และ Molass ความเข้มข้น 5 %(v/v) (กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) (รูปที่ 31)

การศึกษาความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวสูตร YME โดยใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร พบว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปี สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง พีเอช ค่อนข้างกว้าง คือ 4.0 - 5.5 ถ้าอาหารมีค่า pH สูงมากขึ้นตั้งแต่ 7.0 ขึ้นไปจะทำให้การเจริญเติบโตลดลง (รูปที่ 32)

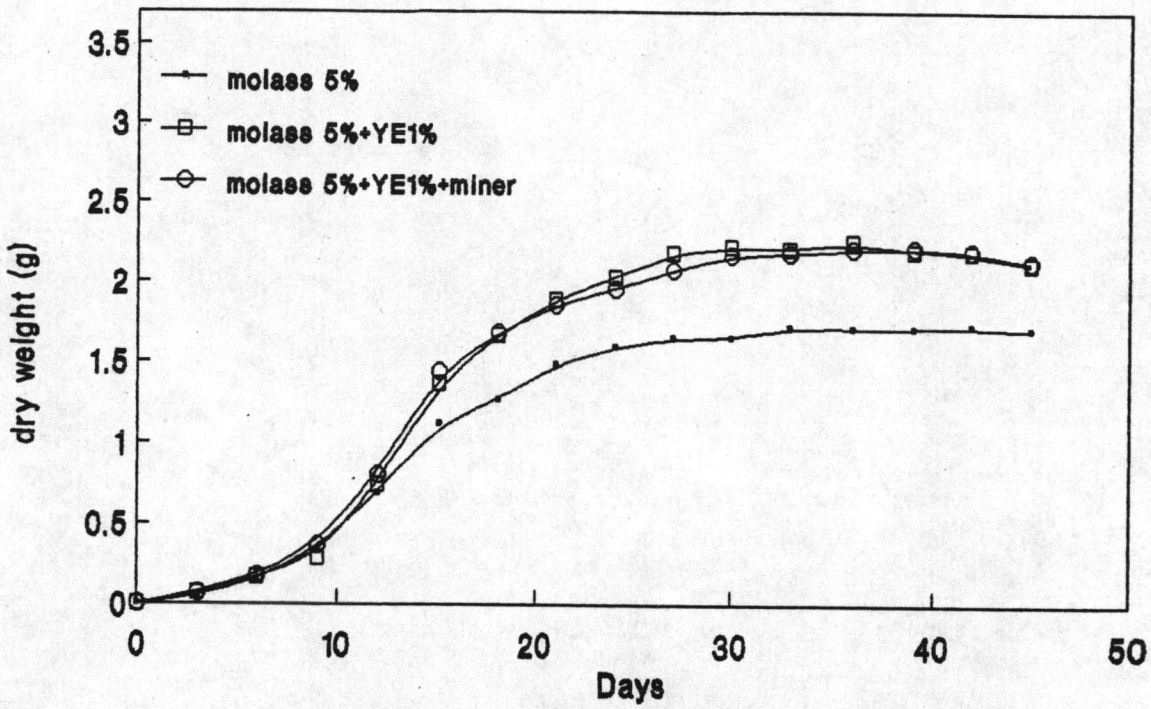
อุณหภูมิที่ใช่บ่มเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวช่วง 28-32°ซ (อุณหภูมิห้อง) จะให้การเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยดีกว่าที่อุณหภูมิ 24-26°ซ เกือบ 2 เท่า (รูปที่ 33)

ลักษณะเส้นใยเห็ดในอาหาร PD จะมีสีน้ำตาลอ่อนส่วนใน YME จะมีสีขาวออกเหลือง การสร้างตุ่มเห็ด จะพบมากใน 2 สูตรนี้มากกว่าใน Molass (รูปที่ 34)

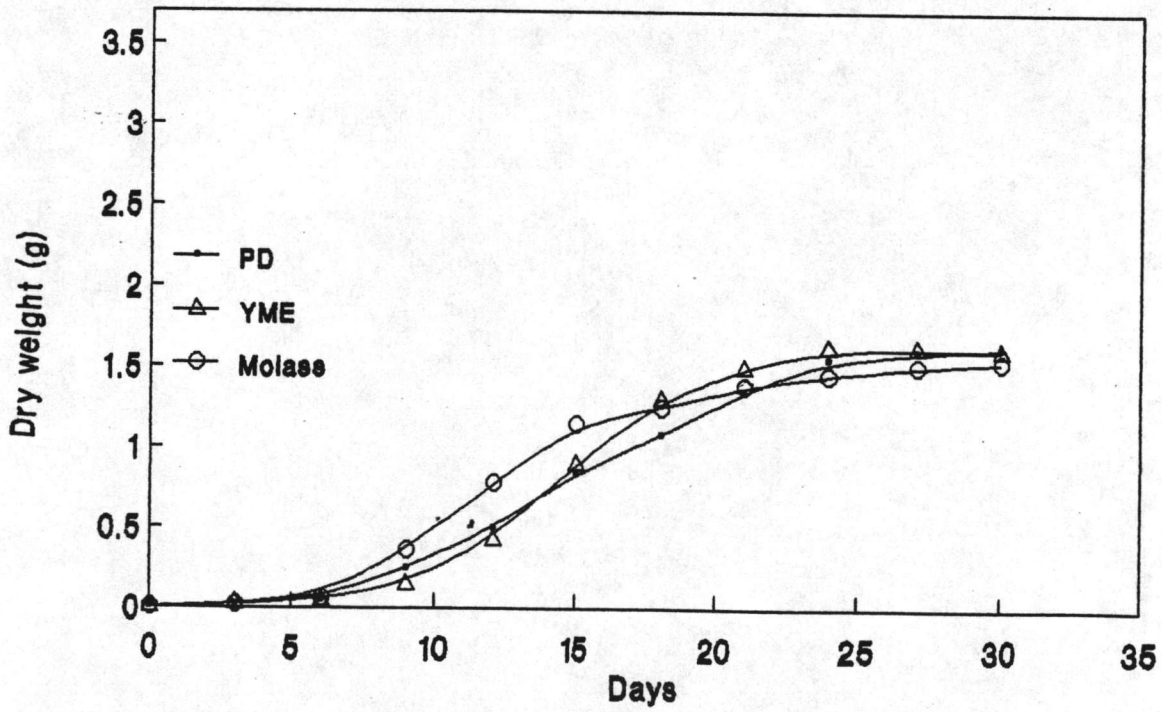
จากการวัดพีเอชในอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ด ระหว่างการเจริญเติบโต พบการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวสูตร PD ซึ่งตามปกติพีเอชจะลดลงอย่างช้า ๆอยู่ในช่วง 5.0-4.2 ถ้าเติมแร่ธาตุ จากสูตรอาหาร YME ทำให้พีเอช ลดลงเร็วและจะลดต่ำกว่านี้ เมื่อไม่มีการเติมแร่ธาตุลงไปในอาหารเลี้ยงคือจะอยู่ประมาณ 5.0-3.8 (รูปที่ 35)

การศึกษาผลของแร่ธาตุต่อการเจริญของเส้นใยในสูตรอาหาร YME ก็ให้ผลเช่นเดียวกับการเลี้ยงในสูตร PD คือ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างจะอยู่ในช่วง 5.0-4.2 การเพิ่มแร่ธาตุบางชนิดเข้าไป เช่น แคลเซียมซัลเฟตจะทำให้พีเอช ลดลงต่ำสุดถึง 1.8 หน่วยพีเอช (รูปที่ 36)

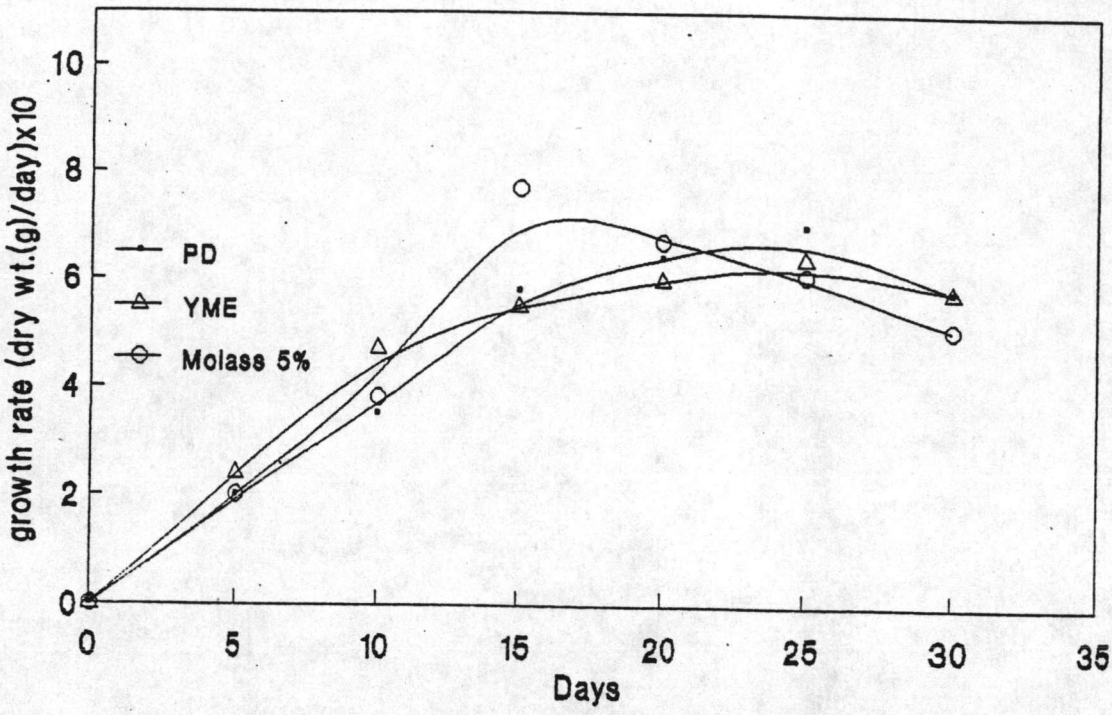
สำหรับสูตรอาหาร Molass การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่เริ่มบ่มเลี้ยงจนกระทั่งมีอายุ 45 วัน พีเอชลดลงจากเดิมประมาณ 1 หน่วยพีเอช และการเติมแร่ธาตุจากสูตรอาหาร YME จะไม่มีผลกระทบกับการเปลี่ยนแปลง pH มากนักเกือบไม่พบความแตกต่างของค่า pH ที่วัดได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *G. lucidum* เท่า 2 สูตรข้างต้น (รูปที่ 37)



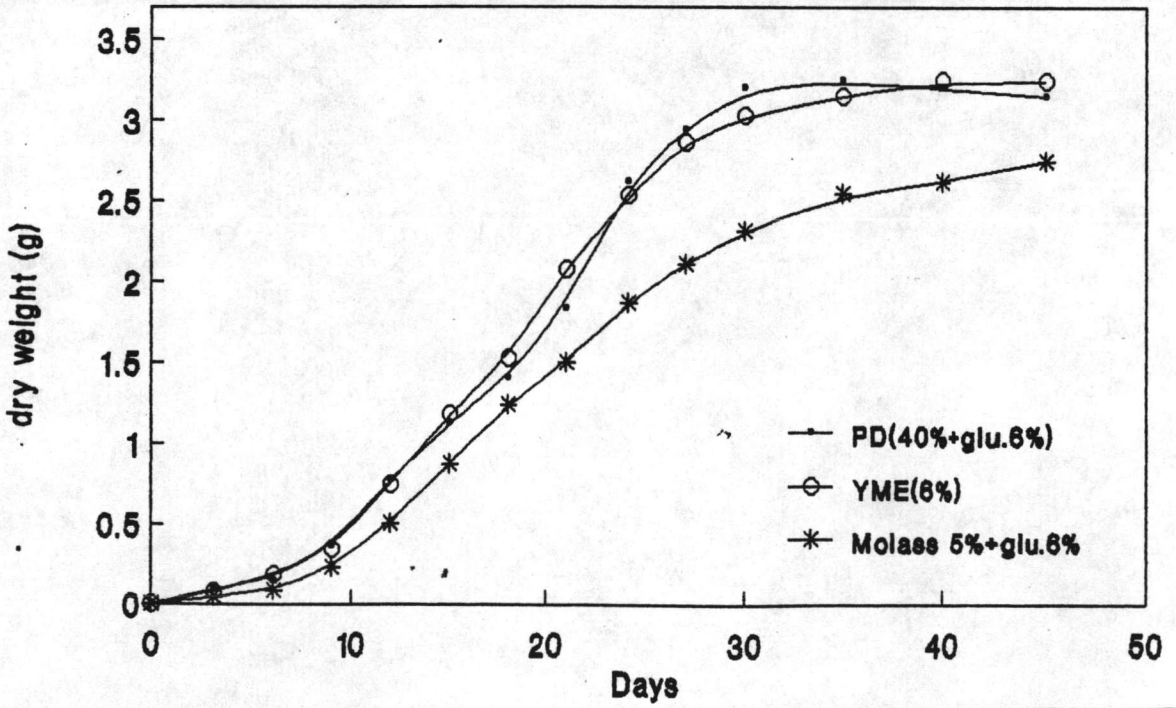
รูปที่ 28 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5 % (v/v) โดยแปรผันชนิดปัจจัยที่เติมในอาหาร



รูปที่ 29 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD(กลูโคส 2%), YM (กลูโคส 2%) และMolass 5 %(v/v)



รูปที่ 30 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร PD(กลูโคส 2%), YM (กลูโคส 2 %) และMolass 5 %(v/v)

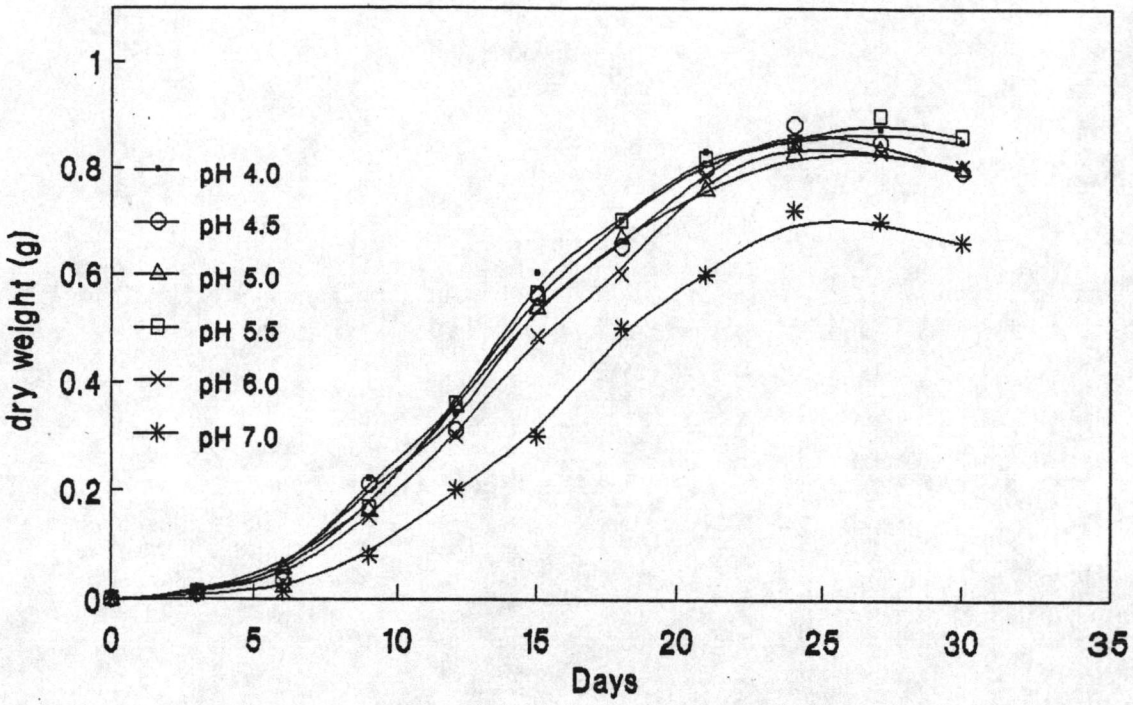


รูปที่ 31 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ ดังนี้

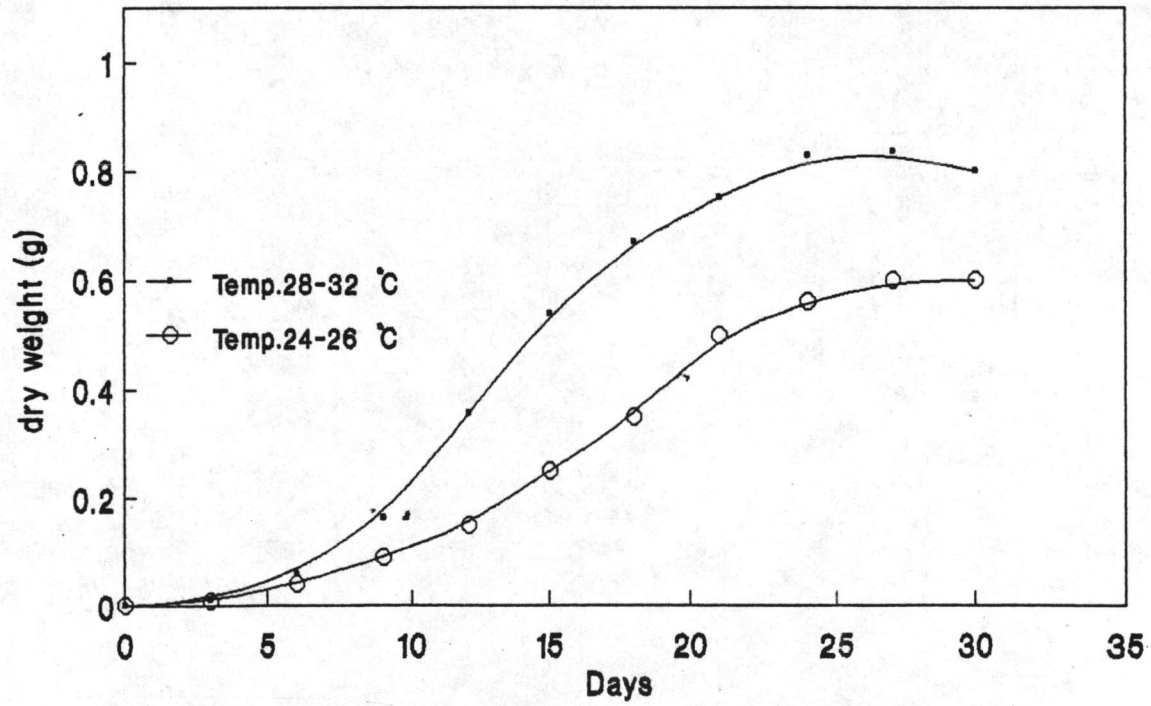
A = PD (มันฝรั่ง 40%+กลูโคส 6%)

B = YME (กลูโคส 6%)

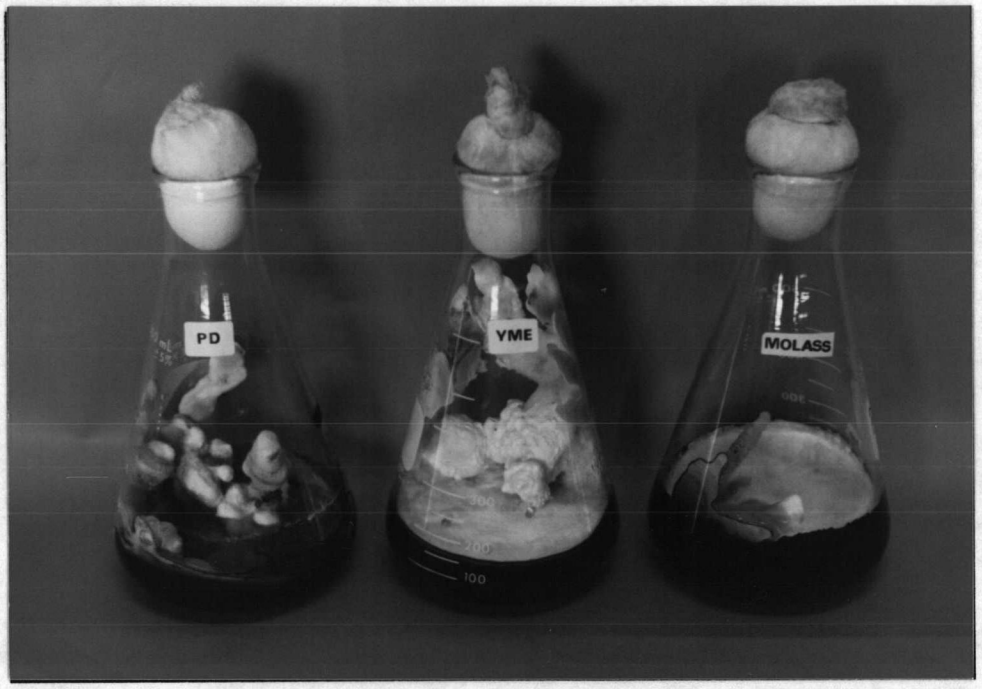
C = Molass (ความเข้มข้น 5%(v/v)+กลูโคส 6%)



รูปที่ 32 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ใช้กลูโคส 2 % โดยปรับ pH เริ่มต้นต่าง ๆกันคือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ7.0



รูปที่ 33 เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปีในอาหารเหลวสูตร YM ใช้กลูโคส 2 % เมื่อเลี้ยงในที่มีอุณหภูมิ 24-26 °ซ กับ 28-32 °ซ

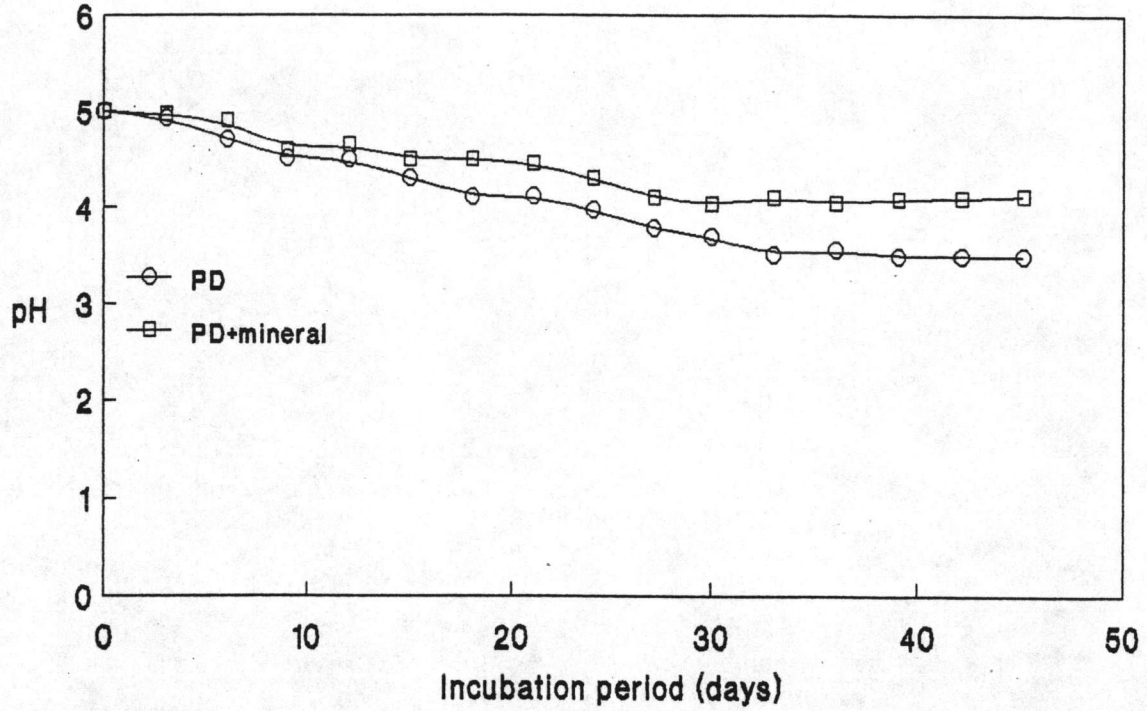


รูปที่ 34 ลักษณะของเส้นใยเห็ด *G. lucidum* บนอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) อายุ 30 วัน

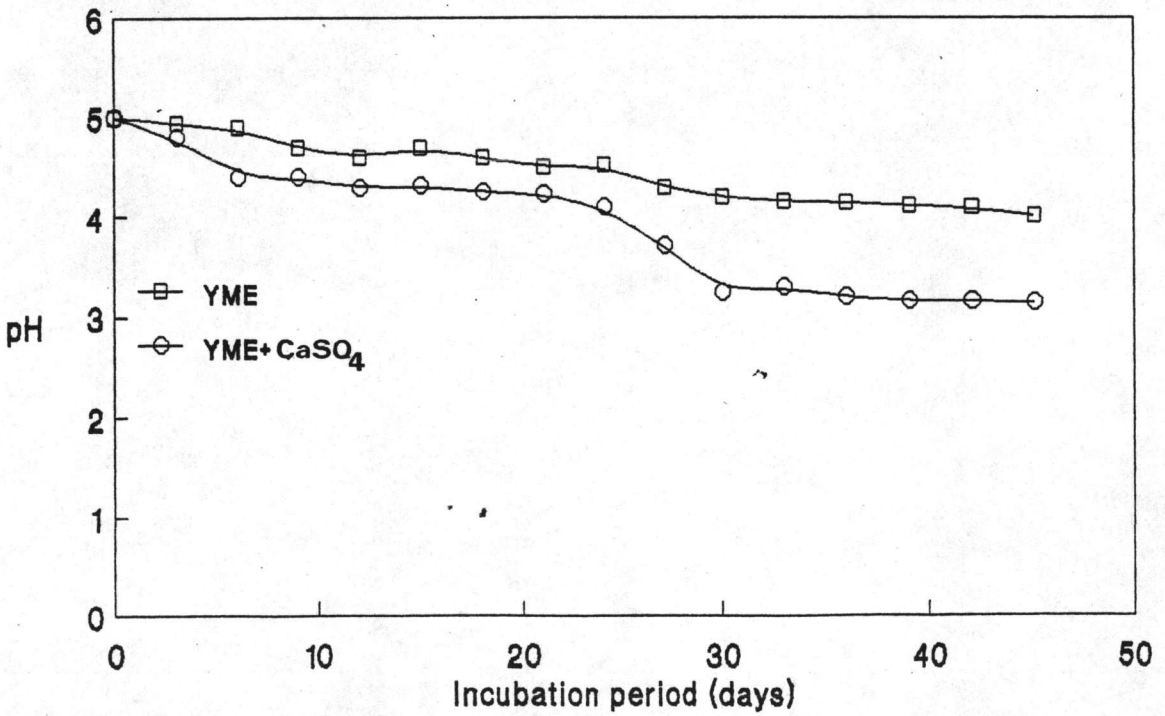
A PD(Potato Dextrose)

B YME(Yeast Malt Extract)

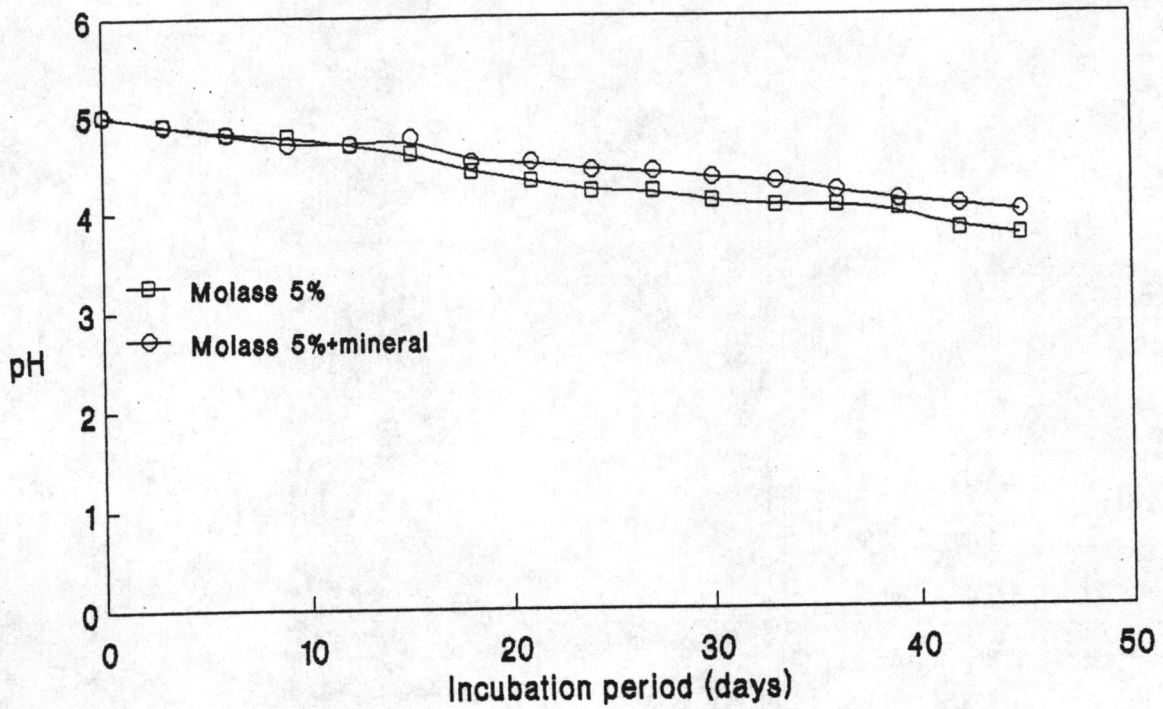
C Molass



รูปที่ 35 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสของอาหารเหลวสูตร PD และ PDเติมแร่ธาตุ ที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(28-32 °ซ)



รูปที่ 36 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสของอาหารเหลวสูตร YME และYME เติม $CaSO_4$ 0.05 % ที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(28-32 °ซ)



รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบสของอาหารเหลวสูตร Molass 5%(v/v) และMolass 5 %(v/v) เติมแร่ธาตุที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{o}ซ)

ในการวิจัยนี้ได้ทำการเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวสูตร PD เพื่อนำไปสกัดหาสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง เนื่องจากเป็นสูตรเดียวกับที่ ปริญญา รัตนพิมาน (2535) ได้ศึกษาไว้ ซึ่งพบว่าสารที่สกัดได้ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน ที่เจริญอยู่ใต้ผิวหนังหนูไร้ขนได้อย่างมีนัยสำคัญ เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลนี้ และศึกษาถึงประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น จึงได้ทำการทดลองในหนู C3H และมะเร็งอีกชนิดหนึ่งคือมะเร็ง Fibrosarcoma

3.2 การศึกษาผลผลิตและคุณลักษณะของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากเห็ดหมื่นปี

3.2.1 การสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปีด้วยน้ำร้อน

ในการสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ พบว่าเมื่อการเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุด (วันที่ 25-30) จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดด้วยแต่ปริมาณโปรตีน จะเริ่มลดลงเล็กน้อยเมื่อเส้นใยหยุดการเจริญ (หลังจากวันที่ 25) ปริมาณกลูโคสที่อยู่ในอาหารจะถูกใช้ลดลงจนหมดในช่วงระยะเวลาเดียวกัน (รูปที่ 38) ผลการทดลอง (ตารางที่ 4 และรูปที่ 39) เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์และโปรตีนในอาหารสูตร PD พบว่าการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับปริมาณแหล่งคาร์บอนคือมันฝรั่งและกลูโคส การใช้มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร กับกลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดถึง 4.8 กรัม (จากน้ำหนักแห้งเส้นใยปั่น 100 กรัม) หากเติมแร่ธาตุจะทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ลดลงครึ่งหนึ่ง แต่จะสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า ในสูตรอาหาร YME ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน (ตารางที่ 5) พบว่าน้ำตาลซูโครส จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงที่สุด 5.38 กรัม (จากน้ำหนักแห้งเส้นใยปั่น 100 กรัม) ฟรุกโตสจะให้การผลิตต่ำสุดคือ 1.45 กรัม (จากน้ำหนักแห้งเส้นใยปั่น 100 กรัม) (รูปที่ 40) การใช้ปริมาณกลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ 5.36 กรัม (จากน้ำหนักแห้งเส้นใยปั่น 100 กรัม) การเติมแคลเซียมซัลเฟต ทำให้การผลิตลดลงจากเดิมครึ่งหนึ่งทั้งปริมาณโพลิแซคคาไรด์และโปรตีน หรือแม้แต่การเพิ่มปริมาณธาตุอาหารของสูตร YME เองก็ทำให้การสร้างสารโพลิแซคคาไรด์ลดลง (ตารางที่ 6 และ รูปที่ 41) การทดสอบความสำคัญของมอลท์สกัด จากตารางที่ 6 จะเห็นว่า การเพิ่มกลูโคสเป็น 2 เท่าในสูตรอาหาร YME

ดัดแปลงไม่ใส่มอลท์สกัด จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ต่ำกว่า กลุ่มที่ใส่มอลท์สกัด และใช้กลูโคสน้อยกว่าครึ่งหนึ่ง แต่จะสร้างโปรตีนสูงกว่า 1.7 เท่าการเพิ่มยีสต์สกัดมากขึ้นจะทำให้การสร้างสารโพลิแซคคาไรด์ลดลง (รูปที่ 42)

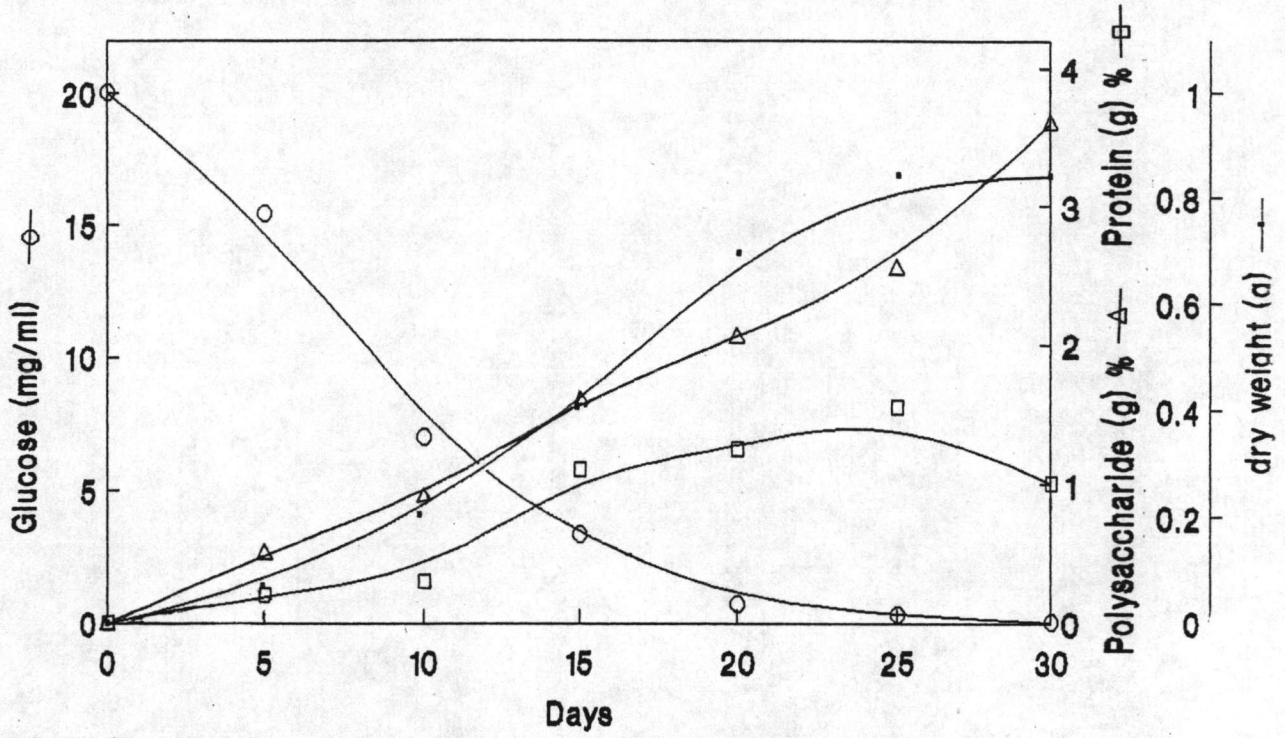
อาหารเหลวสูตร Molass (ตารางที่ 7) พบว่าถ้าใช้ Molass ความเข้มข้น 5 %(v/v) และเพิ่มกลูโคส 40 กรัม/ลิตร จะให้ผลผลิตโพลิแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 9.25 กรัม (จากน้ำหนักแห้งเส้นใยปั่น 100 กรัม) (รูปที่ 43) ส่วนการเพิ่มยีสต์สกัด เพียงอย่างเดียวไม่ช่วยให้ผลผลิตสูงขึ้นต้องให้ร่วมกับแร่ธาตุของสูตรอาหาร YME จะช่วยสร้างสารโพลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น 17 % (รูปที่ 44) แต่การเพิ่มแร่ธาตุให้กับสูตรอาหาร Molass ความเข้มข้น 5 %(v/v) ร่วมกับกลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ต่ำลงถึง 4.7เท่า และโปรตีนลดลง 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่แร่ธาตุ ส่วนการเติมแร่ธาตุใน Molass ความเข้มข้น 1 %(v/v) จะไม่ทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ลดลง (รูปที่ 45)

ดังนั้นองค์ประกอบอาหารที่ทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดในแต่ละสูตร คือ

PD (มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร, กลูโคส 60 กรัม/ลิตร)

YME (กลูโคส 60 กรัม/ลิตร)

และ Molass (ความเข้มข้น 5%(v/v), กลูโคส 40 กรัม/ลิตร) (รูปที่ 46)



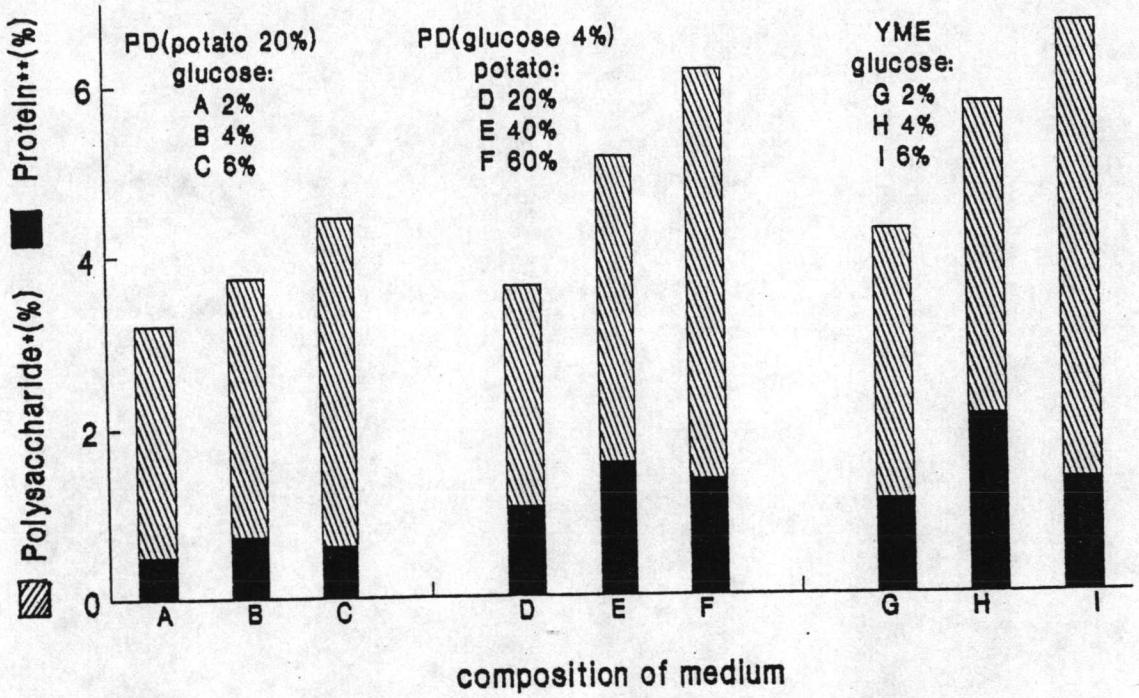
รูปที่ 38 รูปแบบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และปริมาณโปรตีน ที่ระยะต่าง ๆของการเจริญของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM โดยใช้กลูโคส 2 % นาน 30 วัน

ตารางที่ 4 ผลผลิตสูงสุดในการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และโปรตีน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PD โดยสกัดแยกด้วยน้ำและนำไป Dialysis

สูตรอาหาร	องค์ประกอบอาหาร			โพลิแซคคาไรด์[a] (%)	โปรตีน[b] (%)
	มันฝรั่ง(%)	กลูโคส(%)	แร่ธาตุ(%)		
PD	20	20	–	2.70	0.50
	20	20	0.05	1.41	1.52
	20	40	–	3.02	0.72
	20	60	–	3.82	0.61
	40	20	–	2.58	1.05
	40	40	–	3.58	1.55
	40	60	–	4.79	1.36

[a] Anthrone method

[b] Lowry's method



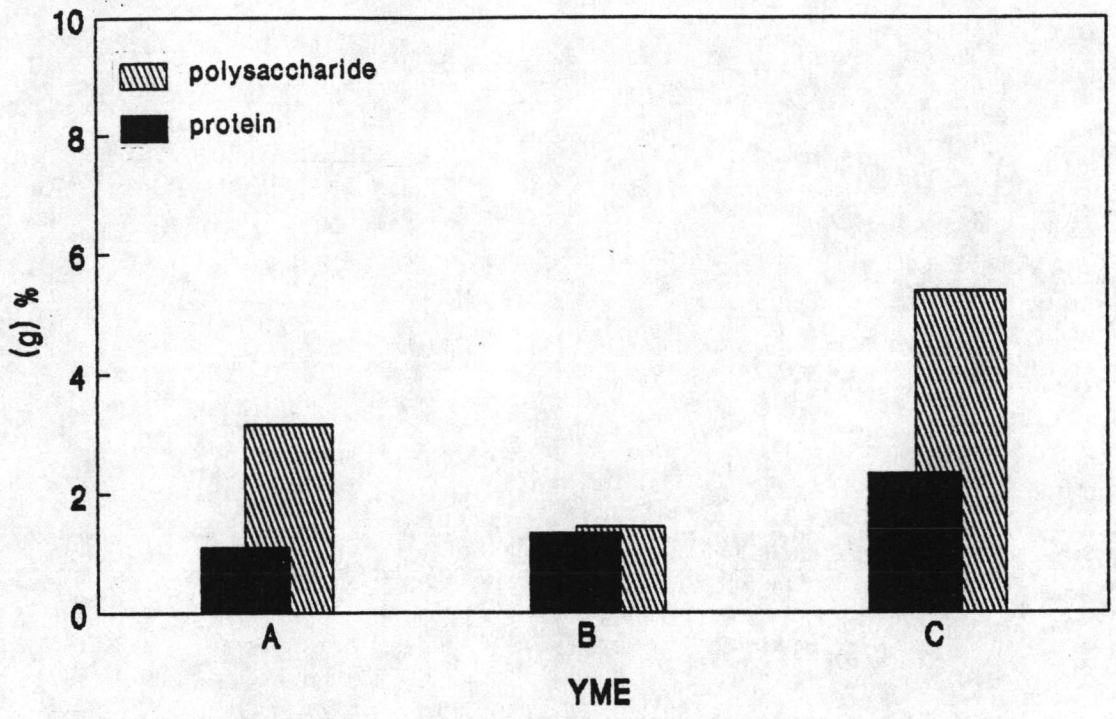
รูปที่ 39 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร PD และ YME ที่แปรผันปริมาณน้ำตาล (2-6%) และมันฝรั่ง (20-60%) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในเวลา 30 วัน

ตารางที่ 5 ผลผลิตสูงสุดในการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และโปรตีน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YME โดยสกัดแยกด้วยน้ำและนำไป Dialysis

สูตรอาหาร	องค์ประกอบอาหาร				โพลิแซคคาไรด์[a] (%)	โปรตีน[b] (%)
	ยีสต์สกัด (%)	มอลท์สกัด (%)	ชนิดน้ำตาล (2%)	แร่ธาตุ (%)		
YME	0.3	0.3	กลูโคส	0.05	3.16	1.10
	0.3	0.3	ฟรุกโตส	0.05	1.45	1.34
	0.3	0.3	ซูโครส	0.05	5.38	2.33

a Anthrone method

b Lowry's method



รูปที่ 40 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ในอาหารเหลวสูตร YME ที่แปรผันชนิดน้ำตาลคือ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ปริมาณ 2 %

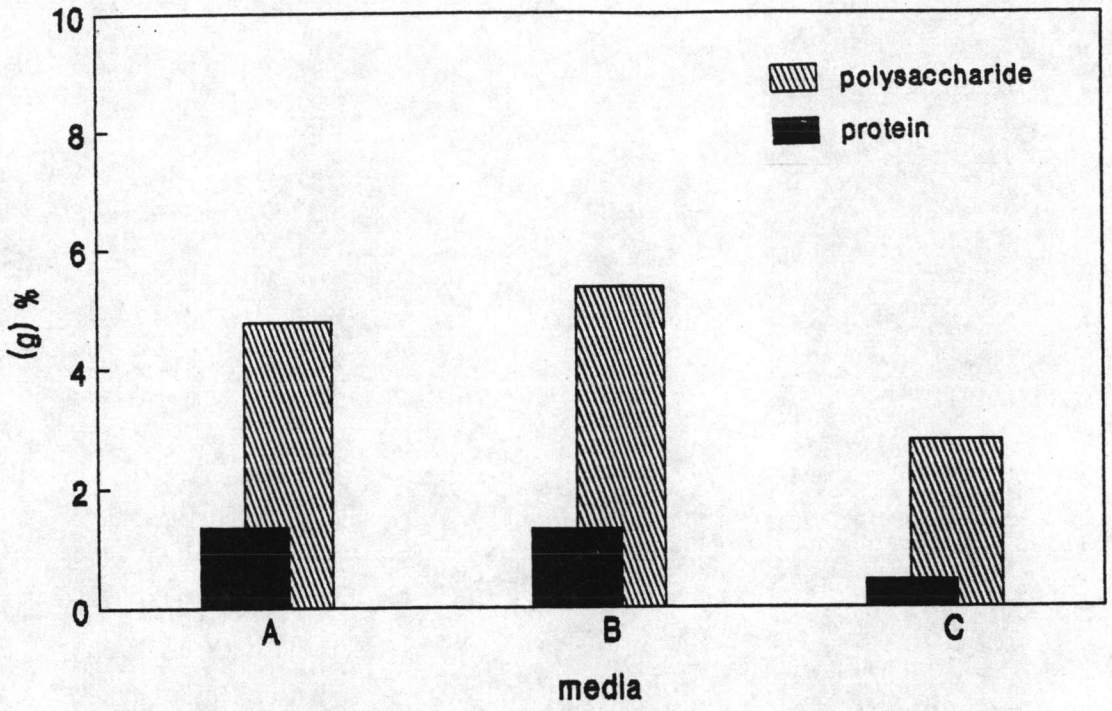
A glucose B fructrose C sucrose

ตารางที่ 6 ผลผลิตสูงสุดในการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และโปรตีน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YME โดยสกัดแยกด้วยน้ำและนำไป Dialysis

สูตรอาหาร	องค์ประกอบอาหาร					โพลิแซคคาไรด์[a] (%)	โปรตีน[b] (%)
	ยีสต์สกัด (%)	มอลท์สกัด (%)	กลูโคส (%)	แร่ธาตุ (%)	ธาตุเสริม (%)		
YME	0.3	0.3	2	0.05	–	3.16	1.10
	0.3	0.3	2	0.10	-	1.23	1.10
	0.3	0.3	2	0.20	-	1.21	1.61
	0.3	0.3	4	0.05	–	3.66	2.08
	0.3	0.3	6	0.05	–	5.36	1.33
	0.3	0.3	6	0.05	$CaSO_4$ 0.05	2.78	0.49
	0.3	–	4	0.05	–	2.87	1.89
	0.6	–	4	0.05	–	2.47	1.54
	1.0	–	4	0.05	–	2.35	1.91

a Anthrone method

b Lowry's method

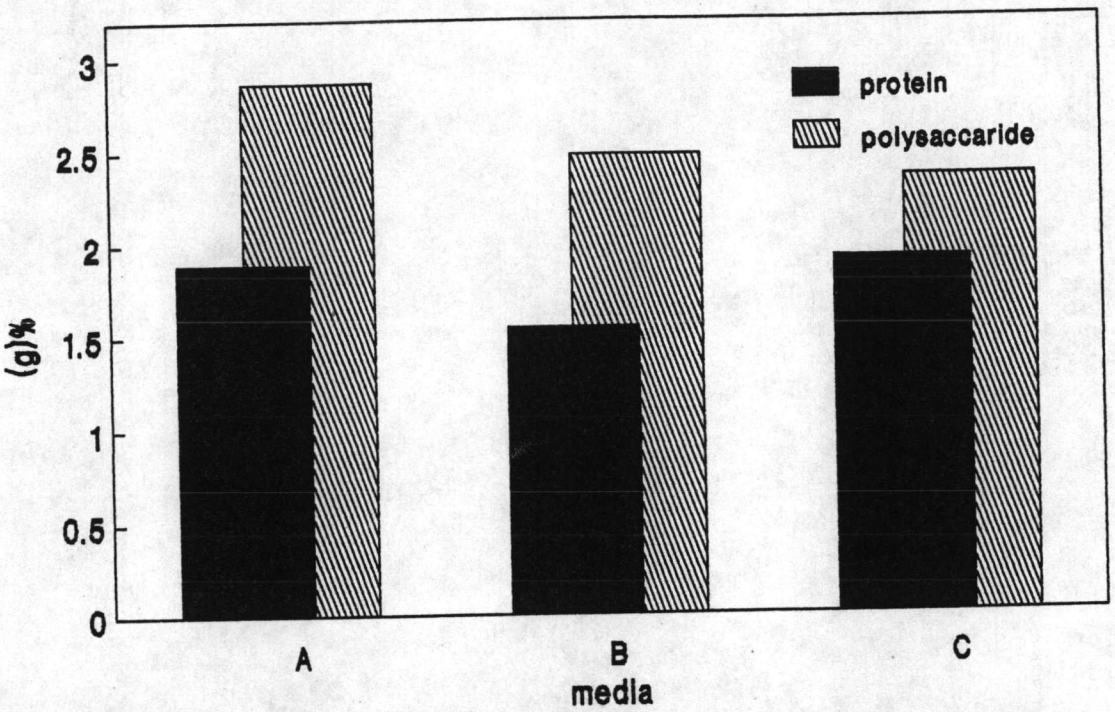


รูปที่ 41 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆคือ

A = PD (potato 40%,glucose 6%)

B = YME (glucose 6%)

C = YME (glucose 6%+$CaSO_4$ 0.05%)



รูปที่ 42 ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี*G. lucidum* ในอาหารเหลว สูตร YME ดัดแปลงไม่ใส่มอลท์สกัด ใช้กลูโคส 4 % โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัดดังนี้

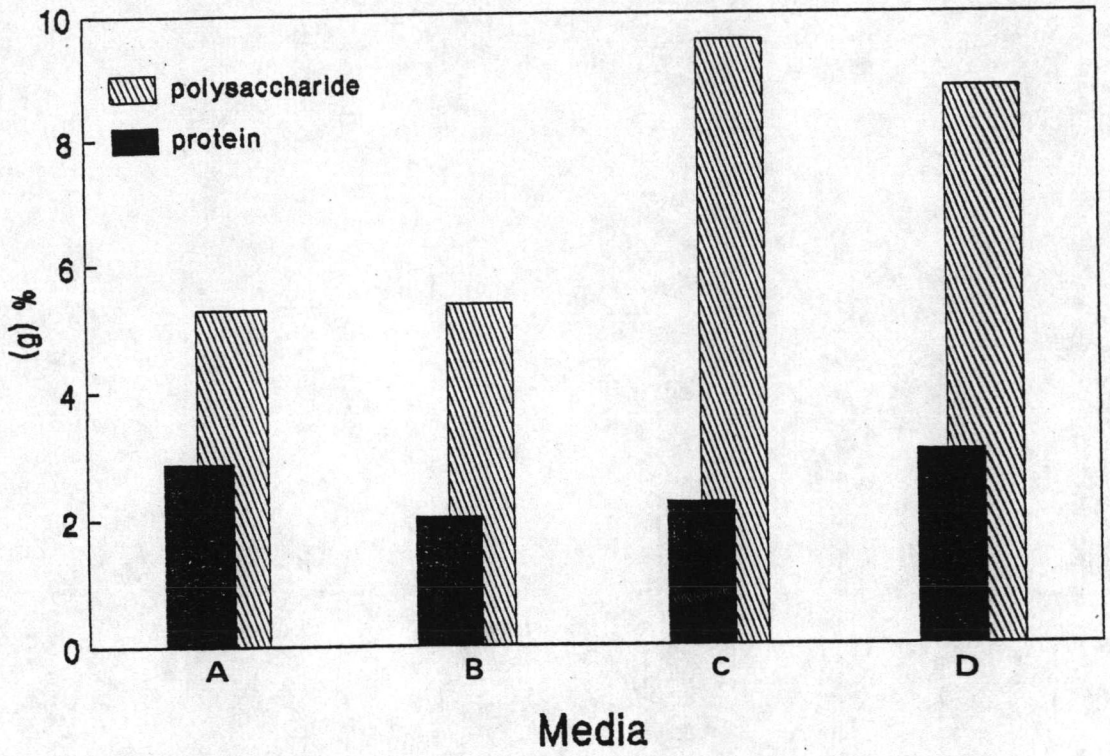
A = 0.3% B = 0.6% C = 1.0%

ตารางที่ 7 ผลผลิตสูงสุดในการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ และโปรตีน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Molass โดยสกัดแยกด้วยน้ำและนำไป Dialysis

สูตรอาหาร	องค์ประกอบอาหาร				โพลิแซคคาไรด์[a] (%)	โปรตีน[b] (%)
	โมลาส (%)(v/v)	กลูโคส (%)	ยีสต์สกัด (%)	แร่ธาตุ (%)		
Molass	7.5	-	-	-	5.56	3.27
	5	-	-	-	5.29	2.87
	5	-	1.0	-	5.12	2.31
	5	-	1.0	0.05	6.38	2.33
	5	2	-	-	5.26	2.02
	5	4	-	-	9.25	2.24
	5	6	-	-	8.68	3.04
	5	6	-	0.05	1.85	1.20
	1	2	-	-	4.91	1.37
	1	4	-	-	6.16	1.85
	1	6	-	-	5.25	0.58
	1	6	-	0.05	5.22	0.55

a Anthrone method

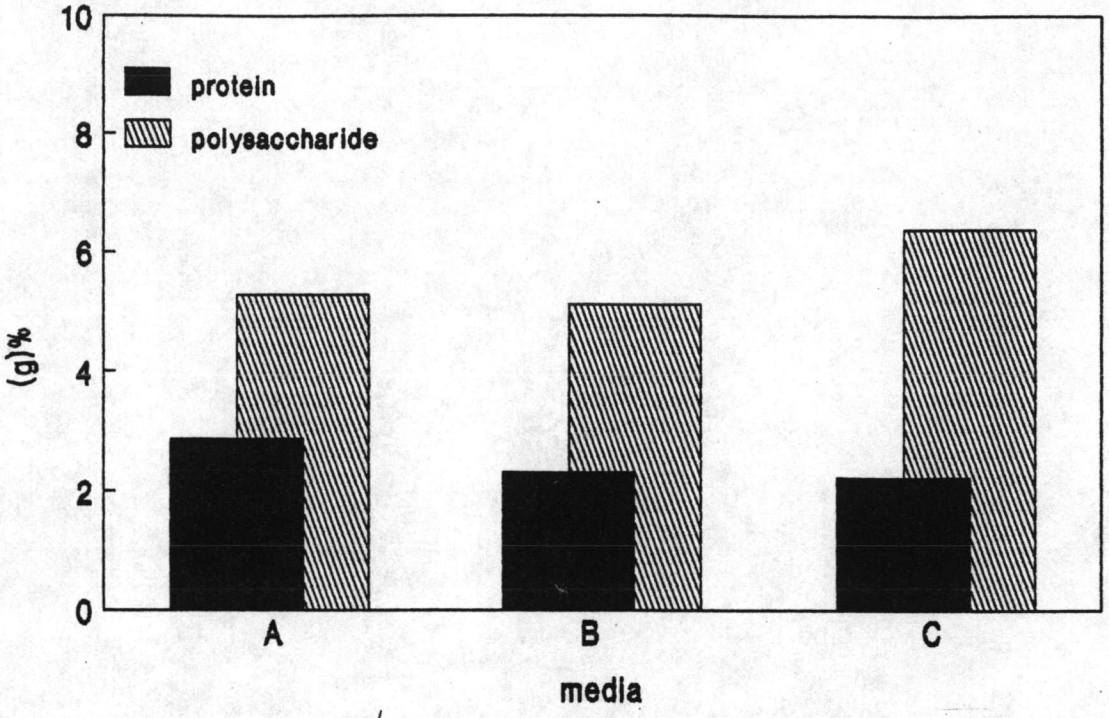
b Lowry's method



รูปที่ 43 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ในอาหารเหลวสูตร Molass 5 %(v/v) ที่แปรผันปริมาณ กลูโคสคือ 0 ,2 ,4 และ6%

กลูโคส : A = 0% C = 4%

B = 2% D = 6%

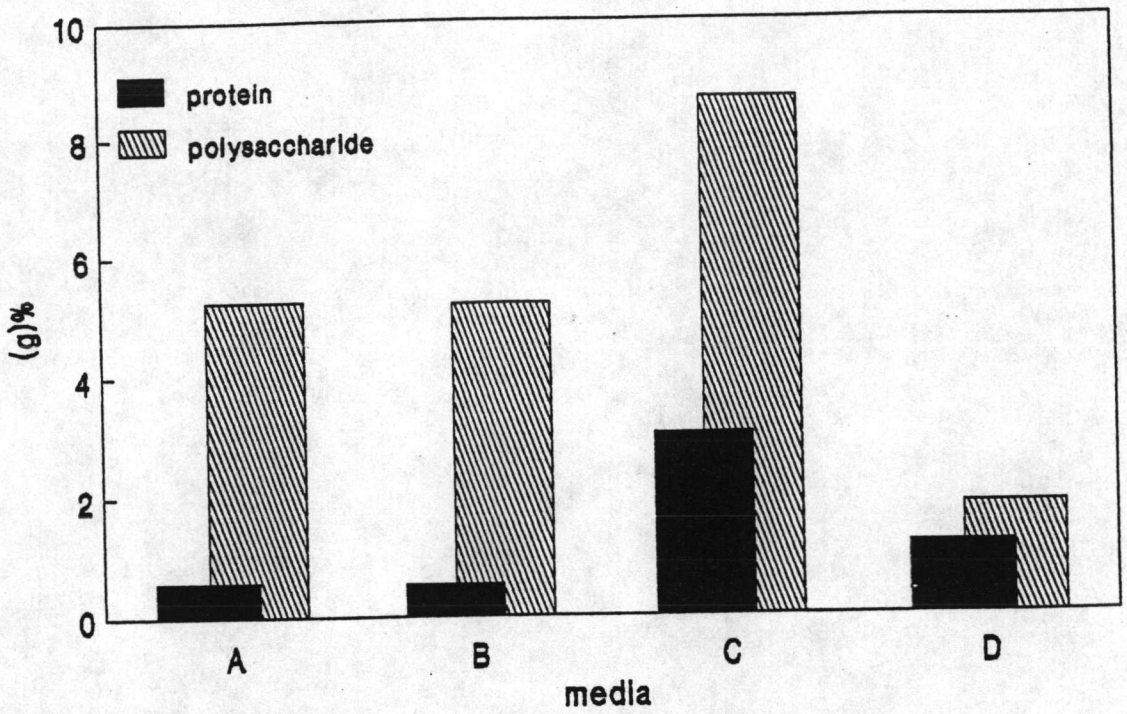


รูปที่ 44 ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่น *G. lucidum* ในอาหารเหลวสูตร Molass ความเข้มข้น 5 %(v/v) โดยเติมสารอาหารดังนี้

A = ไม่เติม

B = ยีสต์สกัด 0.1 %

C = ยีสต์สกัด 0.1 % + แร่ธาตุ 0.05 %



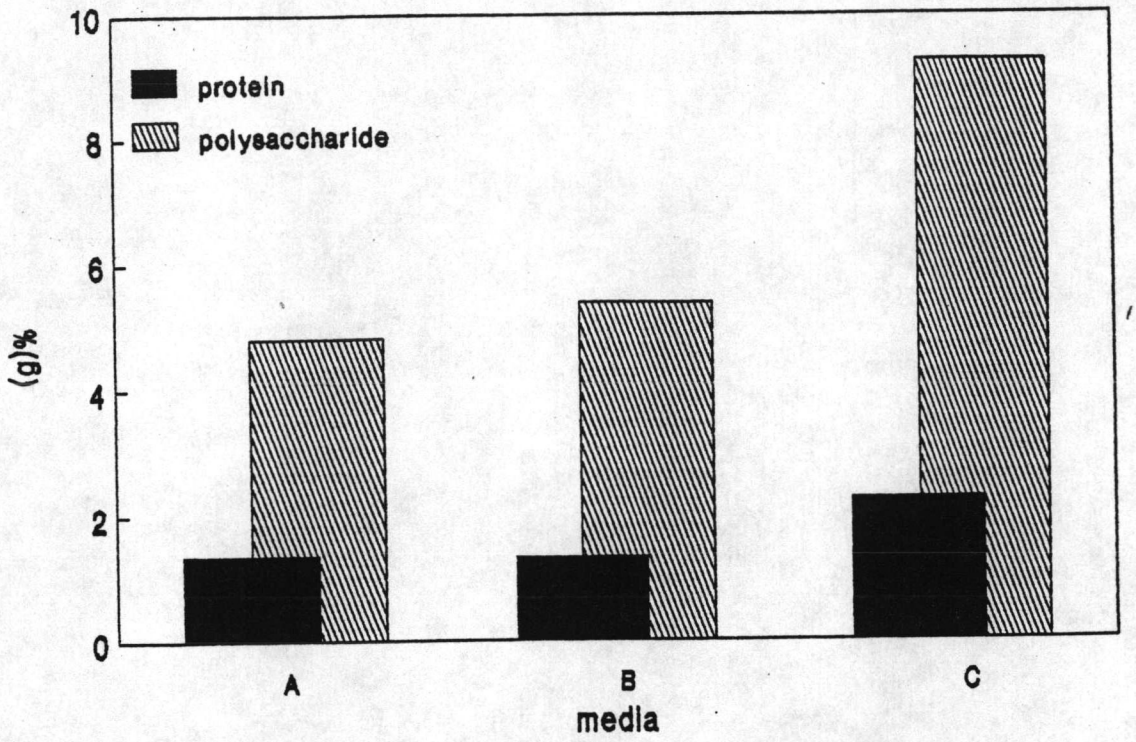
รูปที่ 45 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Molass ดังนี้

A = โมลาสความเข้มข้น 1%(v/v)+กลูโคส 6%

B = โมลาสความเข้มข้น 1%(v/v)+กลูโคส 6%+แร่ธาตุ 0.05%

C = โมลาสความเข้มข้น 5%(v/v)+กลูโคส 6%

D = โมลาสความเข้มข้น 5%(v/v)+กลูโคส 6%+แร่ธาตุ 0.05%



รูปที่ 46 เปรียบเทียบการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆดังนี้

A = PD(มันฝรั่ง 40%, กลูโคส 6%)

B = YME(กลูโคส 6%)

C = Molass(ความเข้มข้น 5%, กลูโคส 4%)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 การสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเอทธานอล

ในการแยกสารต้านมะเร็งจากดอก และเส้นใยเห็ด พบว่า สารสกัดที่ได้เมื่อสกัดด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วย 95% เอทธานอล ทำให้แห้งด้วยอะซิโตน (ข้อ 2.3.2.1) ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าเส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย จะให้ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้เป็นสารสีน้ำตาลอ่อนส่วนที่ได้จากดอกเห็ดจะให้สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเป็นก้อนสามารถบดเป็นผงได้ มีกลิ่นคล้ายน้ำตาลไหม้ และมีรสขม เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตของสารออกฤทธิ์จากดอก และเส้นใยแห้งพบว่า 100 กรัมของสารตั้งต้นจะได้สารสกัดหยาบ 3.04 และ 3.64 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ส่วนอาหารเลี้ยงเส้นใย 10 ลิตร ที่เหลือจากการกรองเส้นใยเห็ดออกไปแล้ว (จะได้น้ำหนักแห้งเส้นใยประมาณ 100 กรัม) จะให้สารสกัดหยาบ 2.9 กรัม ผลผลิตที่สกัดได้เมื่อนำไปตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's และหาปริมาณโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone สารสกัดหยาบที่ได้จากดอกเห็ดมีโปรตีนประมาณ 21% และโพลิแซคคาไรด์ 69.1% สารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยมีโพลิแซคคาไรด์สูงกว่าคือ 84.6% แต่มีโปรตีนต่ำกว่าในดอกมี 5.4% ส่วนในอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดจะมีโปรตีน 4.8% และสารโพลิแซคคาไรด์ 43.6% (ตารางที่ 9)

3.2.3 การทำให้สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อน และตกตะกอนด้วยเอทธานอล ทำการแยกสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์คือ DEAE-cellulose เมื่อชะด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชม. เก็บสารที่ออกมาจากคอลัมน์แฟรกชั่นละ 5 มิลลิลิตร ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร โดยการทำให้เกิดสีด้วย anthrone reagent จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลงกว่า 0.05 หน่วย จึงชะต่อด้วยสารละลาย 0.1 M $NaHCO_3$ ด้วยวิธีการเดียวกัน ผลการทดลอง (รูปที่ 47) แสดงการแยกสารโพลิแซคคาไรด์ ที่ได้จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย พบว่าขั้นตอนการชะด้วยน้ำจะได้พีค ของโปรตีนที่ออกมาจากสารตั้งต้นที่สกัดแยก จะทับกับพีคของสารโพลิแซคคาไรด์ (ที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่แฟรกชั่นที่ 12) ในทำนองเดียวกันพีคของโปรตีน ที่ถูกชะออกมาด้วย 0.1 M $NaHCO_3$ จะให้พีคของโปรตีนทับกับพีคของสารโพลิแซคคาไรด์

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล จากดอก และเส้นใยของเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) สายพันธุ์ G008 โดยใช้ปริมาณตั้งต้น 100 กรัม กับ อาหารเลี้ยงเส้นใย 10 ลิตร

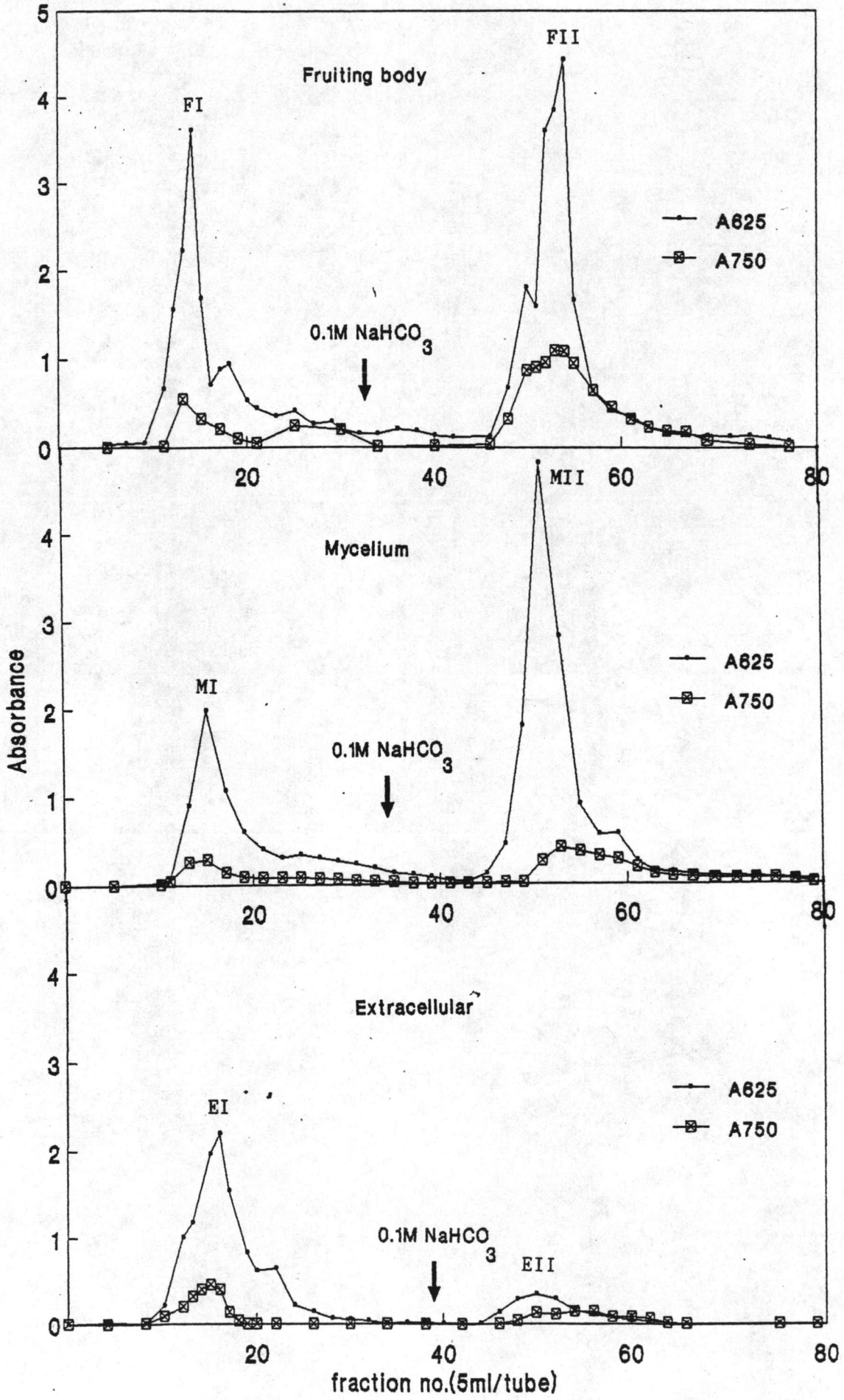
Material	Crude extract (g)	Polysaccharide[a] (%)	Protein[b] (%)
Fruit body[c]	3.04	69.09	21.5
Mycelium[c]	3.64	84.61	5.4
Extracellular[d]	2.90	43.62	4.83

[a] Anthrone method

[b] Lowry's method

[c] 100 grams dry weight

[d] 10 litres culture medium


Fruiting body
FI
FII
A625
A750
0.1M NaHCO3
Mycelium
MI
MII
Extracellular
EI
EII
Absorbance
fraction no.(5ml/tube)

เมื่อรวมแฟรกชั่นที่มีสารโพลิแซคคาไรด์เข้าด้วยกัน นำไปลดปริมาตรทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B

ผลการทดลอง ในรูปที่ 48 เปรียบเทียบการแยกสารโพลิแซคคาไรด์ ที่ได้จากดอกเส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ของเห็ดหมื่นปีด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกันมาก

3.2.4 การทำให้สารต้านมะเร็งบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sepharose 6B

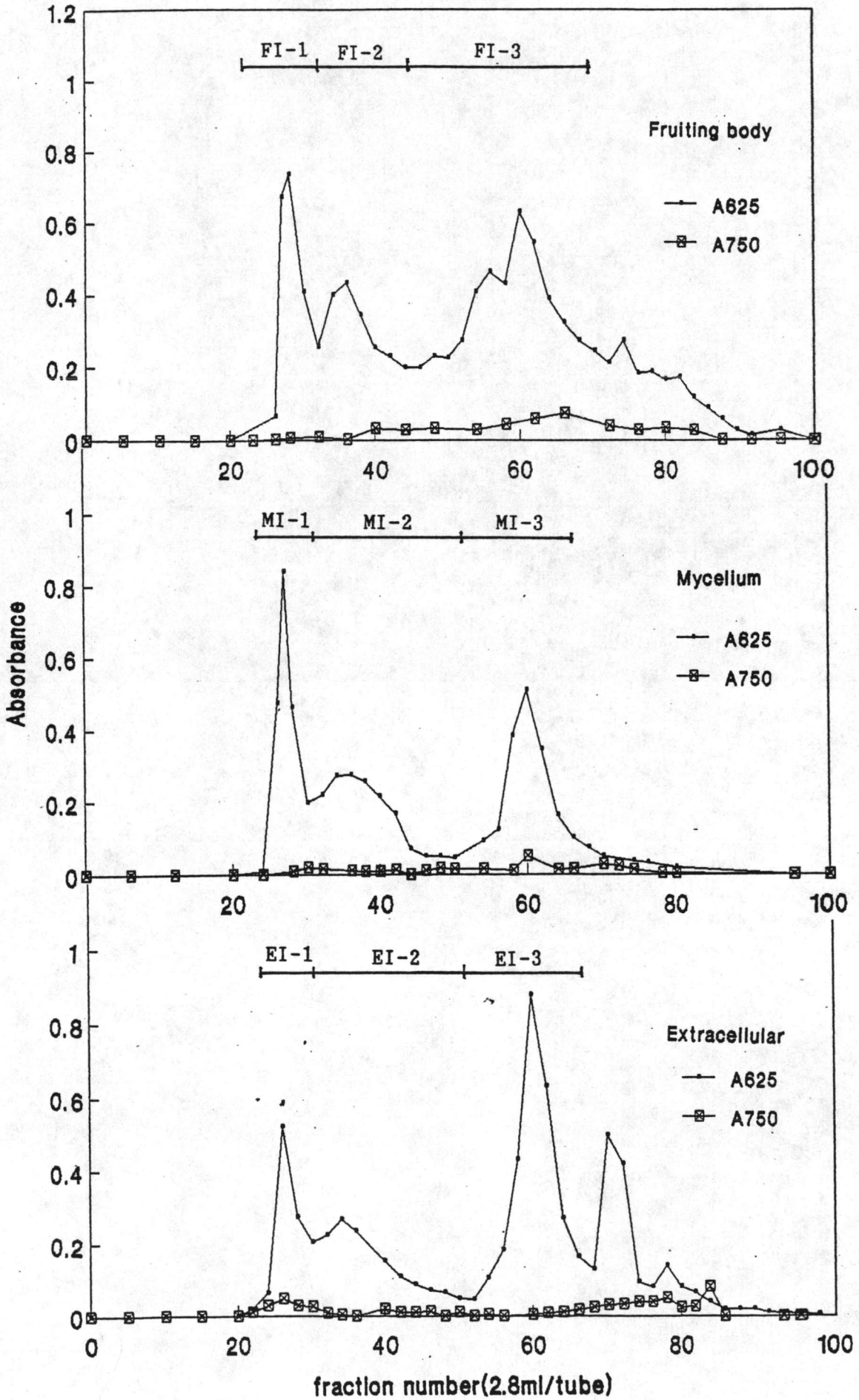
เมื่อนำผลผลิตจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ของเห็ดที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B ติดตามค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนโดยวิธี Lowry's ที่ 750 นาโนเมตร และของสารโพลิแซคคาไรด์ ด้วยการทำให้เกิดสีกับอันโทรน ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร

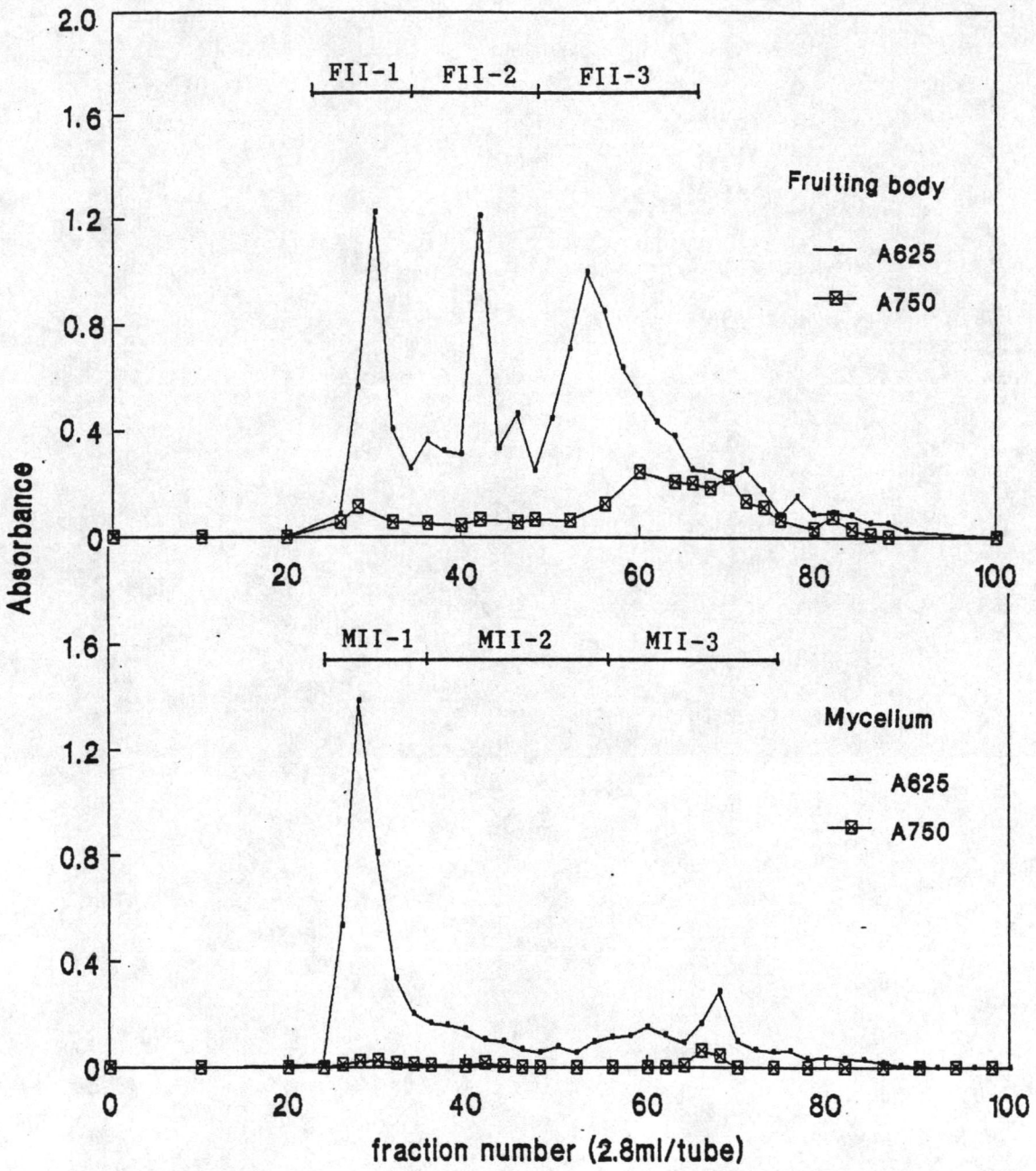
ผลการทดลองในรูปที่ 47 แสดงให้เห็นว่าสารต้านมะเร็งจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยที่ได้จากฟีคที่ 1 ในคอลัมน์ DEAE-cellulose มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพราะเมื่อแยกด้วย Sepharose 6B สามารถกำจัดโปรตีนที่ติดมาได้บางส่วน และพบว่า สารโพลิแซคคาไรด์ที่แยกได้ เป็นสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 3 ฟีค ในเส้นใยและอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดจะเห็นการแยกได้ชัดกว่าในดอกเห็ด

ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ด ในตารางที่ 9 ฟีค FI-1 มีประมาณ 1.27% ฟีค FI-2 มีประมาณ 1.81% และ ฟีค FI-3 มีประมาณ 4.65%

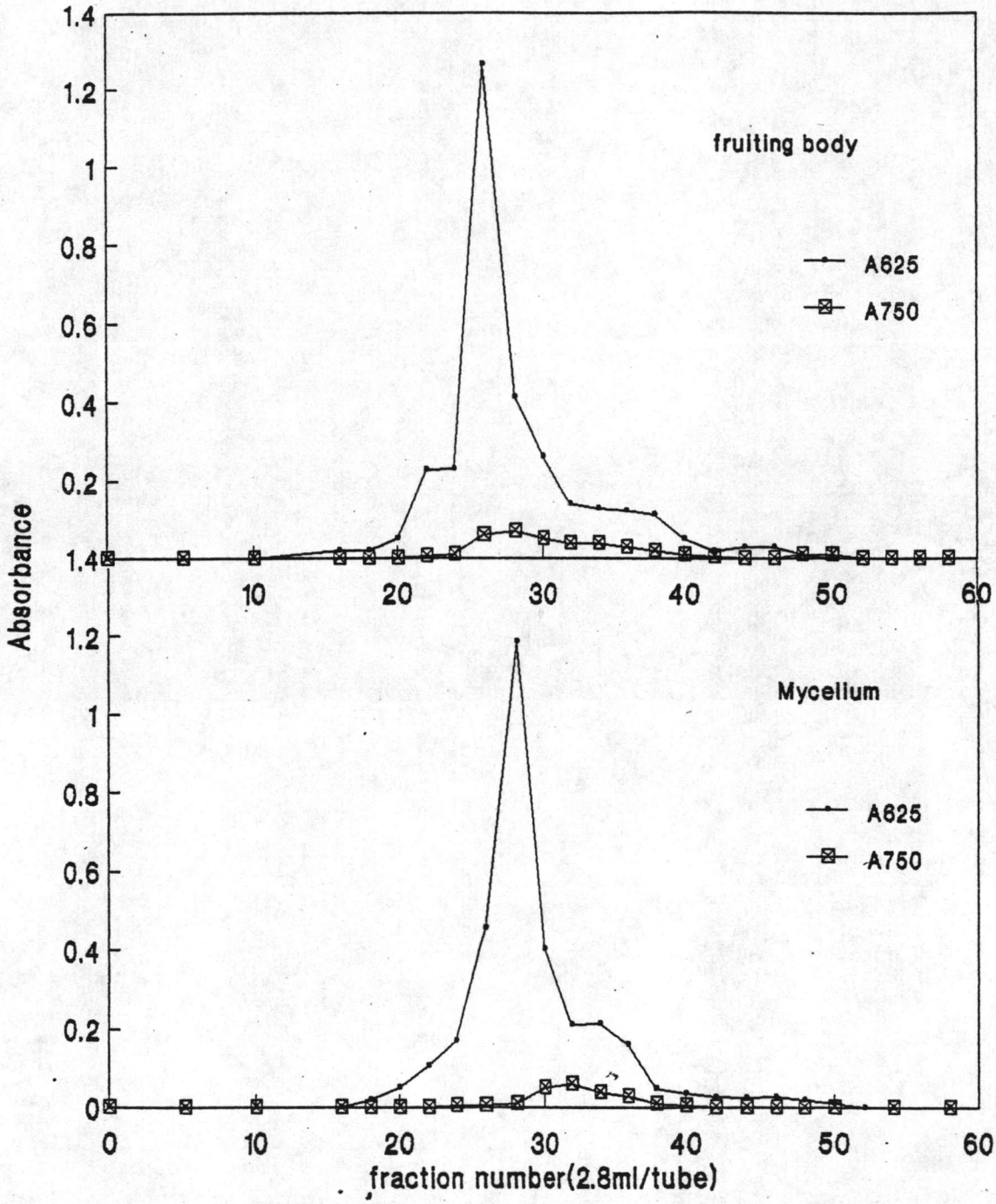
เส้นใยจะให้ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ฟีคที่ MI-1,MI-2 และMI-3 ประมาณ 7.74%, 5.16% และ 6.79% ตามลำดับ และในอาหารเลี้ยงเส้นใย จะให้ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ฟีค EI-1, EI-2 และ EI-3 ประมาณ 3.4%, 3.3% และ 0.83% ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน ผลการทดลองในรูปที่ 49 แสดงให้เห็นว่า สารต้านมะเร็ง ฟีคที่ 2 จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ในดอก และเส้นใยเห็ด เป็นสารโพลิแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน 3 ฟีคใหญ่ คล้ายฟีคที่ 1 ในดอกเห็ดจะให้ผลผลิต ฟีค FII-1, FII-2 และ FII-3 ประมาณ 13.9%, 10.58% และ 11.34% ส่วนเส้นใยเห็ดจะให้ฟีค MII-1 สูงกว่าฟีค


FI-1
FI-2
FI-3
Fruiting body
A625
A750
MI-1
MI-2
MI-3
Mycelium
A625
A750
EI-1
EI-2
EI-3
Extracellular
A625
A750
Absorbance
fraction number(2.8ml/tube)



รูปที่ 49 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอก และ เส้นใย ของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล สารเริ่มต้นความเข้มข้น .01 กรัม/มล. ปริมาตร 2 มล. ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้จากพีคที่ 2 ไปผ่านคอลัมน์Sepharose 6B ขนาด 1.8x90 ซม. ชะด้วยน้ำกลั่นอัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บแฟรกชั่นละ 2.8 มล.2.8 มล.วิเคราะห์โปรตีน (A750) และสารโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone (A625)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อื่น ๆ มากคือ 23.65% สำหรับ พีค MII-2 และ MII-3 มีประมาณ 4% และ 6.11% (ตารางที่ 9)

จากผลการทดลองที่ได้ พีคแรกของทั้งพีคที่ 1 และ 2 คือ FI-1, FII-1และ MI-1, MII-1 จะให้ผลผลิตสูงกว่าพีคอื่น ๆ จึงทำการศึกษาถึงขนาดของโมเลกุล โดยรวมพีคแรกของทั้งพีคที่ 1 และ 2 แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B อีกครั้งหนึ่ง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 42 จะเห็นว่า พีคที่ 1 และ 2 จะออกมาที่ตำแหน่งต่างกันเล็กน้อย ในดอกจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่แฟรกชั่นที่ 28 ส่วนในเส้นใยจะอยู่แฟรกชั่นที่ 26 หรือกล่าวได้ว่าขนาดของโมเลกุลเฉลี่ยของสารที่แยกได้จากดอกมีขนาดใหญ่กว่าที่ได้จากเส้นใยเล็กน้อย

3.2.5 การทำให้สารต้านมะเร็งบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sepharose 6B ครั้งที่ 2

เมื่อนำผลผลิตจาก ดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ของเห็ดที่แยกได้จากคอลัมน์ Sepharose 6B ในแต่ละพีคไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่งติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 และ 625 นาโนเมตร ตามลำดับ

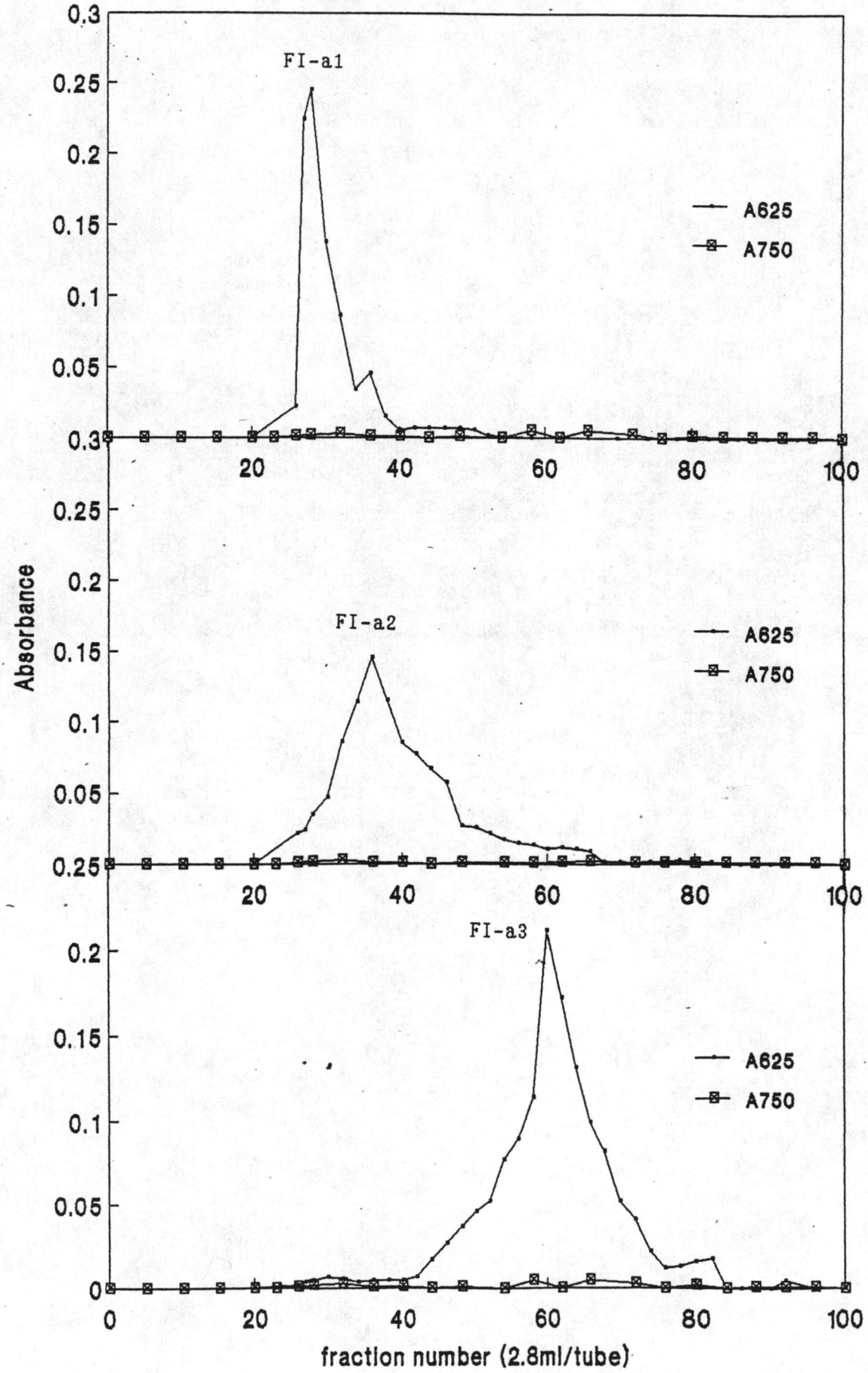
ผลการทดลอง รูปที่ 51 พีคที่ 1 ในดอก จะให้ความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เพราะสามารถกำจัดโปรตีนได้เกือบหมด ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ พีค FI-1a, FI-2a และ FI-3aจะอยู่ในช่วง 1-4 % (ตารางที่ 9) ส่วนในเส้นใยและอาหารเลี้ยงเส้นใย สารที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น แต่ยังพบโปรตีนอยู่เล็กน้อย (รูปที่ 52 และ 53) ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ ที่ได้จากเส้นใยและอาหารเลี้ยงเส้นใยจะอยู่ในช่วง 4-6 % และ 0.6-3 % ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

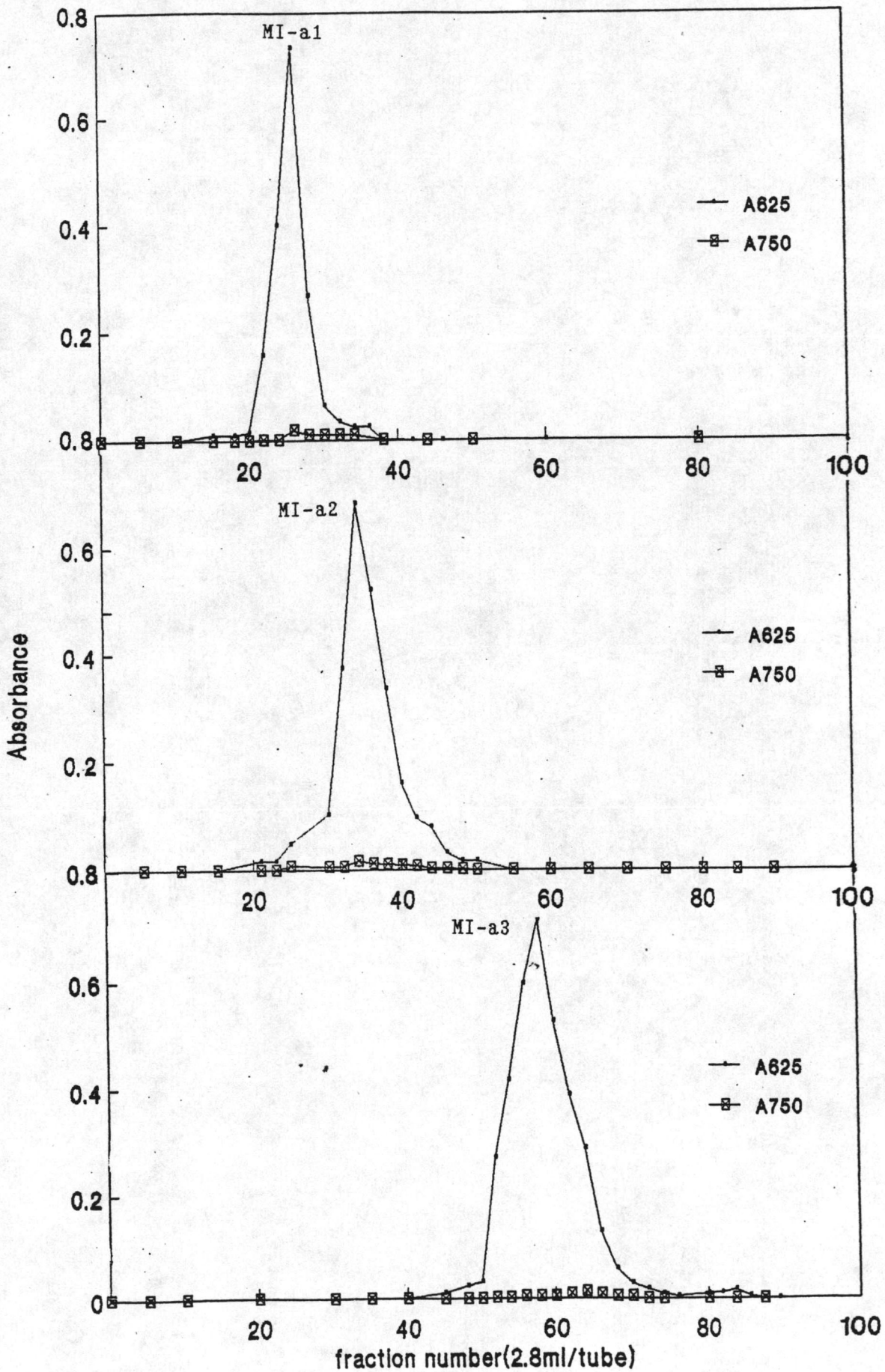
ในทำนองเดียวกันสำหรับพีคที่ 2 ในดอก (รูปที่ 54) จะพบว่ามีโปรตีนลดลง 1ใน 3 จากคอลัมน์ที่ผ่านมา ผลผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ พีค FII-1b, FII-2b และ FII-3b คือ 11.1%, 8.5% และ 9.0% ตามลำดับ ส่วนในเส้นใย (รูปที่ 55) ถึงแม้ว่าจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถกำจัดโปรตีนได้หมด โปรตีนที่เหลือเมื่อเทียบปริมาณแล้ว ยังน้อยกว่าในดอก ผลผลิตของสารโพลิแซคคาไรด์ พีค MII-1b, MII-2b และ MII-3b ประมาณ 18.9%, 3.2% และ 4.9% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

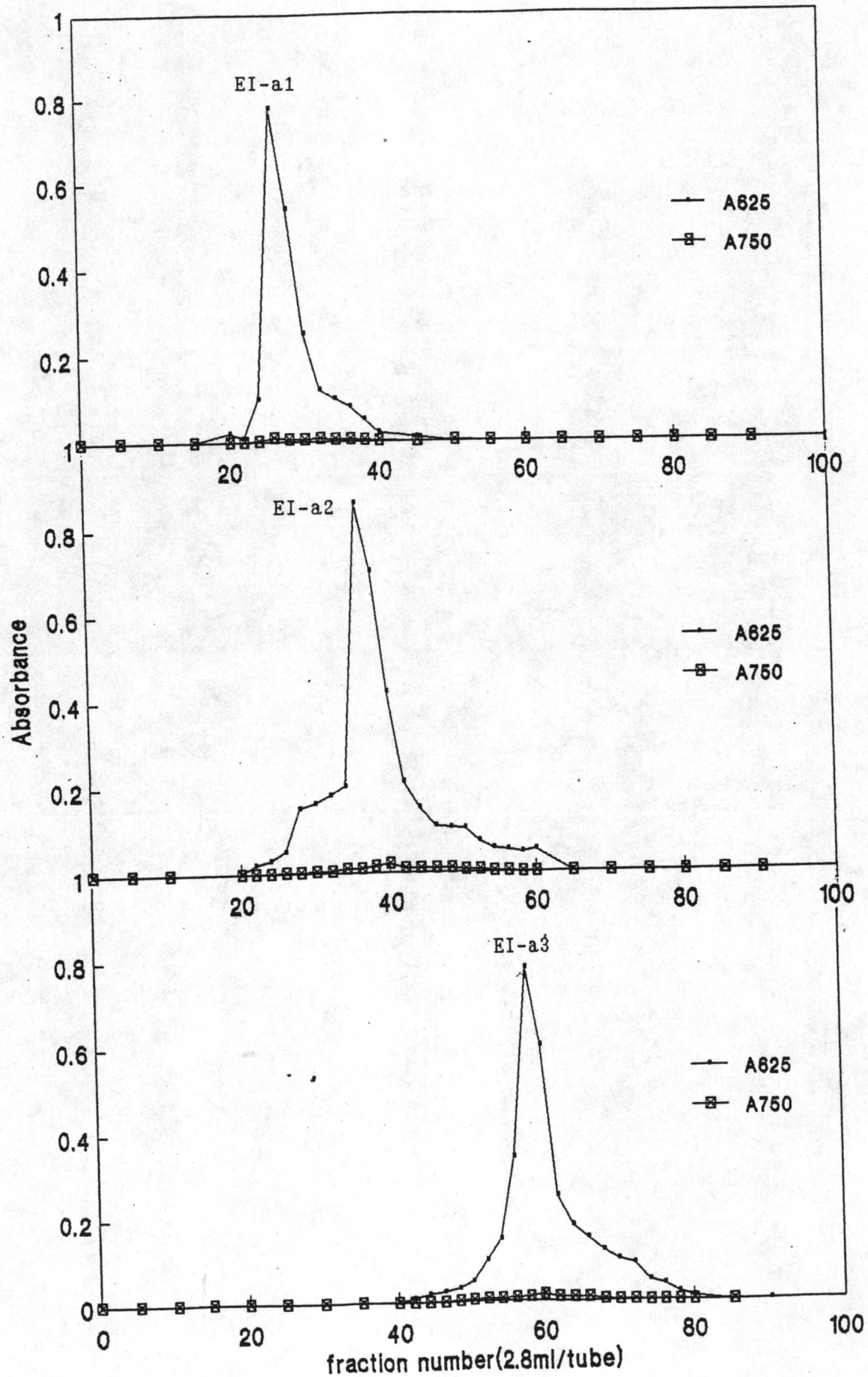
รูปที่ 51 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอก ของเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*)ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล สารเริ่มต้นความเข้มข้น .01 กรัม/มล. ปริมาตร 2 มล.ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้จากพีคที่ 1 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด 1.8x90 ซม. ชะด้วยน้ำกลั่น อัตราการไหล 20 มล./ชม. นำสารที่แยกได้คือพีค FI-1,FI-2 และ FI-3ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง วิเคราะห์โปรตีน (A750) และสารโพลิแซค

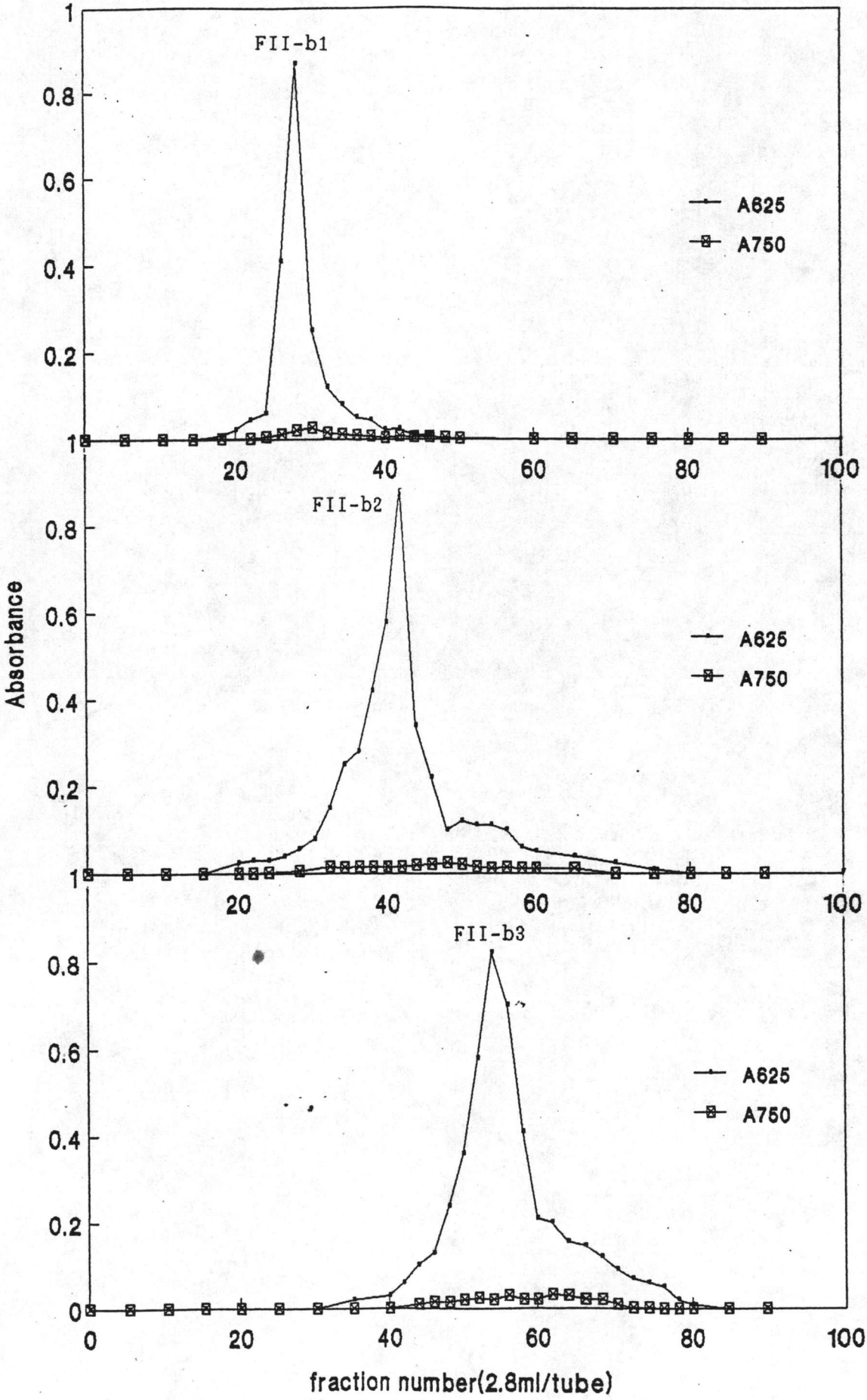
รูปที่ 52 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใย ของเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล สารเริ่มต้นความเข้มข้น .01 กรัม/มล. ปริมาตร 2 มล.ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้จากพีคที่ 1 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด 1.8x90 ซม. ชะด้วยน้ำกลั่น อัตราการไหล 20 มล./ชม. นำสารที่แยกได้คือพีค MI-1,MI-2 และ MI-3 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง วิเคราะห์โปรตีน (A750) และสารโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone (A625)

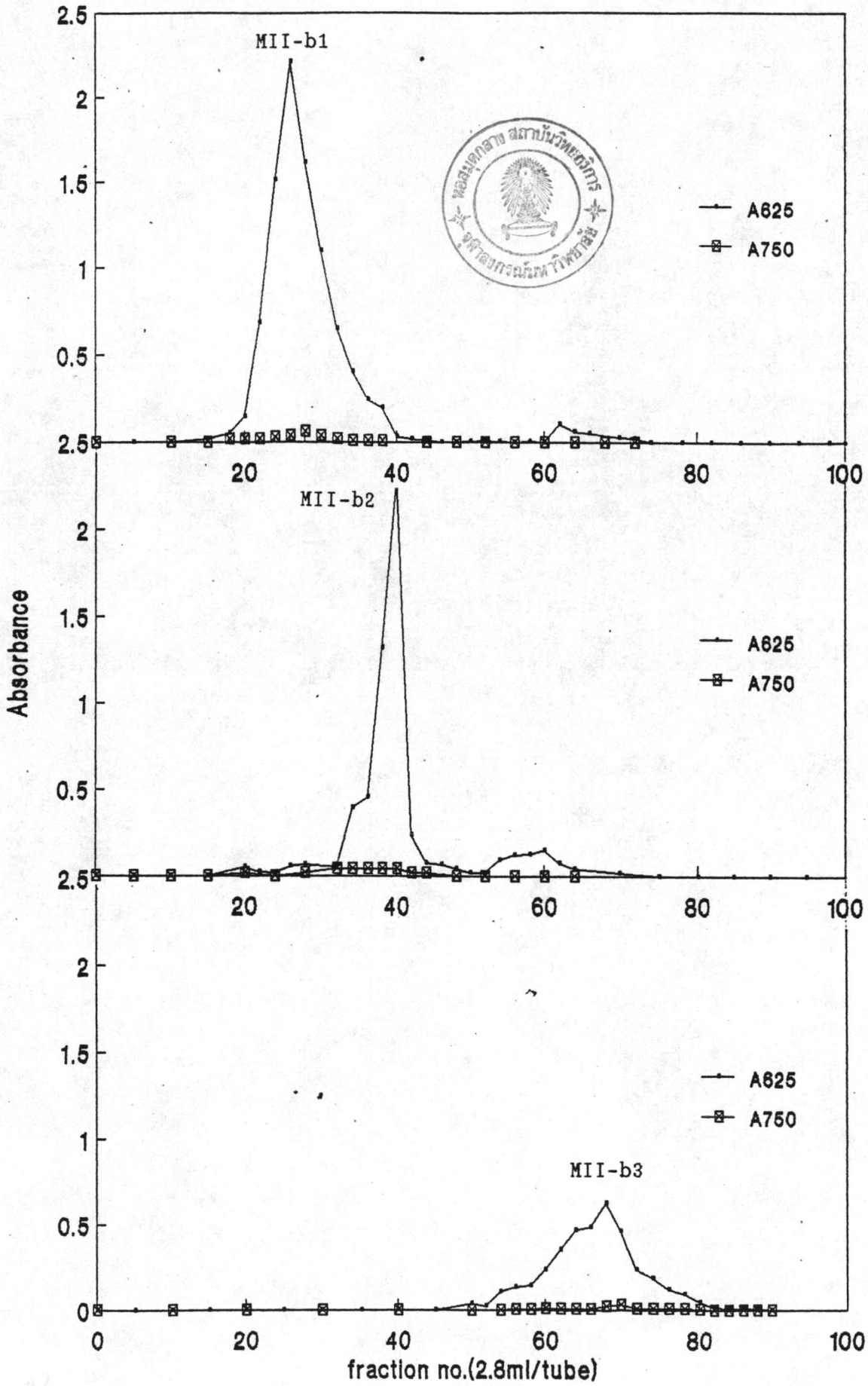
รูปที่ 53 กราฟแสดงการแยกสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใย ของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่สกัดแยกด้วยน้ำ และตกตะกอนด้วยเอทธานอล สารเริ่มต้นความเข้มข้น .01 กรัม/มล. ปริมาตร 2 มล.ทำให้บริสุทธิ์ดยาใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และนำสารที่เก็บรวบรวมได้จาก พีคที่ 1 ไปผ่าน คอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด 1.8 x 90 ซม. ชะด้วยน้ำกลั่นอัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บแฟรกชั่นละ 2.8 มล. รวมสารที่แยกได้คือ พีค EI-1 , EI-2 และ EI-3 ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เติมอีกครั้งหนึ่งวิเคราะห์โปรตีน (A750) และสารโพลิแซคคาไรด์ โดยวิธี Anthrone (A625)


FI-a1
FI-a2
FI-a3
A625
A750
Absorbance
fraction number (2.8ml/tube)
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
20
40
60
80
100


MI-a1
MI-a2
MI-a3
A625
A750
Absorbance
fraction number(2.8ml/tube)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
20
40
60
80
100


EI-a1
EI-a2
EI-a3
A625
A750
Absorbance
fraction number(2.8ml/tube)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
20
40
60
80
100


FII-b1
FII-b2
FII-b3
A625
A750
Absorbance
fraction number(2.8ml/tube)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
20
40
60
80
100


MII-b1
MII-b2
MII-b3
A625
A750
Absorbance
fraction no.(2.8ml/tube)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
20
40
60
80
100

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6B โดยใช้สารตั้งต้น 100 กรัม

Fraction	Fruit-body		Fraction	Mycelium		Fraction	Extracellular	
	Polysac.[a] (%)	Protein[b] (%)		Polysac.[a] (%)	Protein[b] (%)		Polysac.[a] (%)	Protein[b] (%)
F_0	69.09	21.50	M_0	84.64	5.40	E_0	43.62	4.83
FI	13.57	1.12	MI	28.72	0.98	EI	11.15	0.88
FII	37.12	9.64	MII	42.14	2.04	EII	2.43	1.83
FI-1	1.27	.010	MI-1	7.74	.032	EI-1	3.41	.072
FI-2	1.81	.014	MI-2	5.16	.009	EI-2	3.30	.070
FI-3	4.65	.036	MI-3	6.79	.021	EI-3	0.83	.018
FII-1	13.93	0.08	MII-1	23.65	.560	-		
FII-2	10.58	1.28	MII-2	4.04	.096	-		
FII-3	11.34	1.37	MII-3	6.11	.145	-		
FI-1a	1.02	.004	MI-1a	6.19	.012	EI-1a	2.73	.020
FI-2a	1.45	.010	MI-2a	4.13	.008	EI-2a	2.64	.015
FI-3a	3.72	.020	MI-3a	5.43	.010	EI-3a	0.66	.010
FII-1b	11.14	.005	MII-1b	18.92	.210	-		
FII-2b	8.46	0.20	MII-2b	3.23	.036	-		
FII-3b	9.07	0.25	MII-3b	4.89	.054	-		

a Anthrone methode

b Lowry's methode

ตารางที่ 10 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*

fraction	Polysaccharide[a] (%)	Protein[b] (%)	Purification fold	% recovery
F_o	69.09	21.50	1	100
FI	13.57	1.12	3.8	19.6
FII	37.12	9.64	1.2	53.8
FI-1	1.27	0.01	39.7	1.8
FI-2	1.81	0.01	40.4	2.6
FI-3	4.65	0.04	40.4	6.7
FII-1	13.93	0.08	54.4	20.2
FII-2	10.58	1.28	8.3	15.3
FII-3	11.34	1.37	8.3	16.4
FI-1a	1.02	.004	79.6	1.5
FI-2a	1.45	.010	45.3	2.1
FI-3a	3.72	.020	58.1	5.4
FII-1b	11.14	.005	69.6	16.1
FII-2b	8.46	0.20	13.2	12.3
FII-3b	9.07	0.25	11.7	13.1

[a] Anthrone method

[b] Lowry's method

ตารางที่ 11 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*

fraction	Polysaccharide[a] (%)	Protein[b] (%)	Purification fold	% recovery
M_o	84.64	5.40	1	100
MI	28.72	0.98	1.9	33
MII	42.14	2.04	1.3	50.2
MI-1	7.74	.032	24.6	9.2
MI-2	5.16	.009	36.5	6.1
MI-3	6.79	.021	20.6	8.0
MII-1	23.65	.560	2.7	27.9
MII-2	4.04	.096	2.7	4.8
MII-3	6.11	.145	2.7	7.2
MI-1a	6.19	.012	32.9	7.3
MI-2a	4.13	.008	32.9	4.9
MI-3a	5.43	.010	34.6	6.4
MII-1b	18.92	.210	5.7	22.4
MII-2b	3.23	.036	5.7	3.8
MII-3b	4.89	.054	5.2	5.9

[a] Anthrone method

[b] Lowry's method

ตารางที่ 12 การทำให้บริสุทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*

fraction	Polysaccharide[a] (%)	Protein[b] (%)	Purification fold	% recovery
E_o	43.62	4.83	1	100
EI	11.15	0.88	1.4	25.6
EII	2.43	1.83	0.2	5.6
EI-1	3.41	.072	5.3	7.2
EI-2	3.30	.070	5.2	7.6
EI-3	0.83	.018	4.6	1.9
EI-1a	2.73	.020	15.2	6.3
EI-2a	2.64	.015	19.6	6.1
EI-3a	0.66	.010	7.3	1.5

[a] Anthrone method

[b] Lowry's method

3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์

ผลการเปรียบเทียบ คุณสมบัติของสารโพลิแซคคาไรด์ ที่สกัดแยกได้จากเห็ดหมื่นปี (ข้อ 2.3.2.3) เมื่อศึกษาความบริสุทธิ์ โดยวิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ต่าง ๆ (ข้อ 2.3.3)

จากการวัดค่าจุดหลอมเหลว และการคำนวณค่า specific rotation(C=.005, น้ำกลั่น) (ตารางที่ 13) สารประกอบที่ผลิตได้จาก ดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกัน จุดหลอมเหลวที่วัดได้อยู่ในช่วง 250-360 องศาเซลเซียส และเมื่อสังเกตุค่า specific rotation ซึ่งวัดในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซนต์ มีค่าอยู่ในช่วง +32.8 ถึง +70.29 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การหามวลโมเลกุล ของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ โดยใช้ dextran เป็นสารมาตราฐาน (รูปที่ 56) ผลการทดลองตารางที่ 13 พีคแรก ของพีคที่ 1 และ 2 ในดอก เส้นใย และ อาหารเลี้ยงเส้นใย มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง $1x10^6$ - $2x10^6$ พีคสอง(FII-1,MII-1) อยู่ในช่วง $6x10^4$ - $50x10^4$ และพีคสาม(FII-3,MII-3) $3x10^4$ - $11x10^4$ ดาลตัน

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ทำการทดสอบคุณบัติต้านมะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากเห็ดหมื่นปีโดยใช้เซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma ของหนู C3H ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscle) บริเวณโคนขา (ข้อ 2.3.4.1) เพื่อดูการยืดอายุของหนู(วัน)

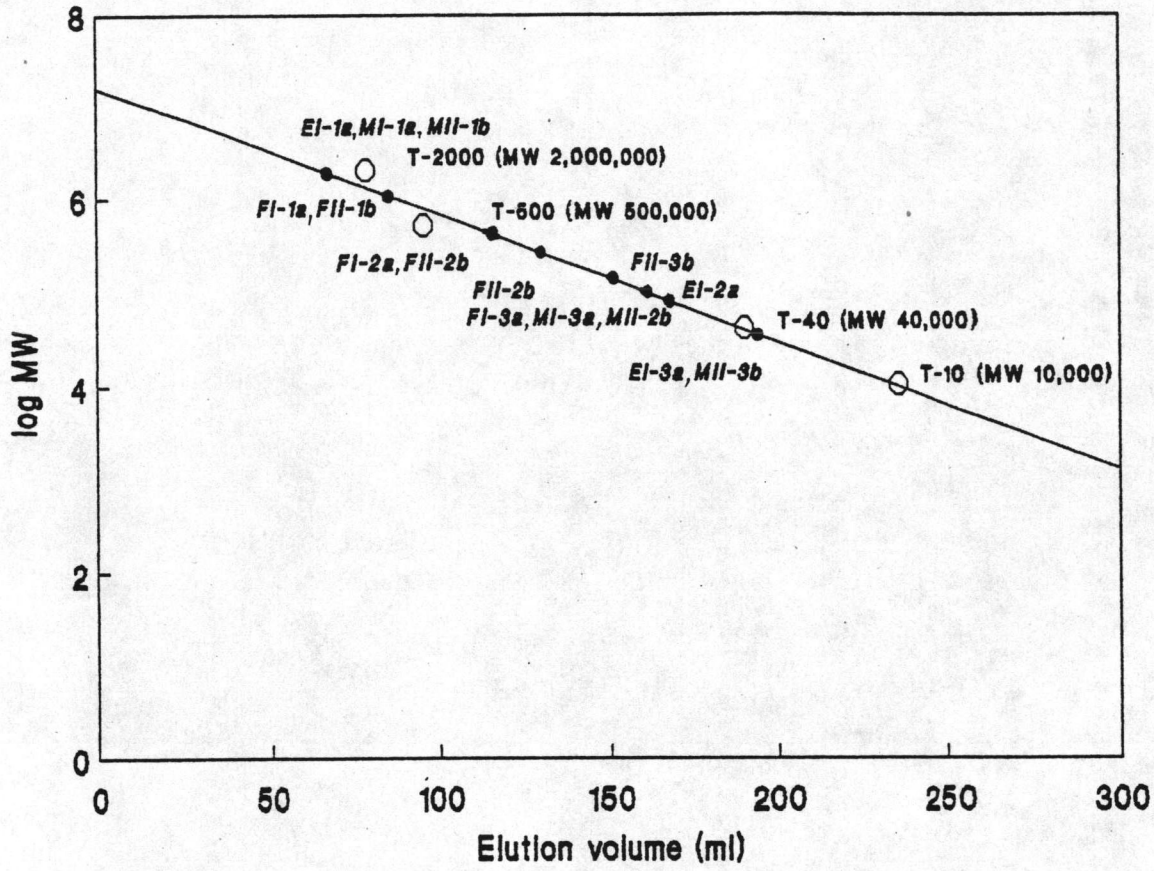
ผลการทดลอง(ตารางที่ 14 และ รูปที่ 57) แสดงให้เห็นว่า จำนวนเซลล์มะเร็งที่ฉีดให้หนูในปริมาณที่แตกต่าง ๆ กัน จะทำให้หนูมีชีวิตอยู่ได้ด้วยอายุที่ต่างกัน ถ้าให้จำนวนเซลล์น้อยกว่า $3x10^4$ เซลล์ จะอยู่รอดมากกว่า 20 วัน หลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เซลล์จำนวนน้อยที่สุด ที่จะทำให้หนูทดลองเป็นมะเร็งทุกตัวคือ $2x10^4$ เซลล์ หรือ 0.3 %(w/v) โดยระยะเวลาเฉลี่ยที่จะทำให้หนูดังกล่าวตายหมด คือ 30.8+4.7 วัน

ผลการทดลองเมื่อทดสอบความสามารถ ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารออกฤทธิ์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล หลังจากฉีด

ตารางที่ 13 คุณสมบัติทางกายภาพของสารโพลิแซคคาไรด์ จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) ที่สกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ทำให้บริสุทธิ์โดยนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6B

สารประกอบโพลิแซคคาไรด์	จุดหลอมเหลว (^{o}c)	ค่าSpecific rotation ($[\alpha]_D^{25}$)(c=.005,น้ำกลั่น)	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)x10^4
FI-1a	270-280	+66.10	125.89
FI-2a	260-270	+70.29	50.10
FI-3a	272-280	+58.12	6.31
FII-1b	362[D]	+32.80	125.89
FII-2b	250-262	+58.03	31.62
FII-3b	276-278	+50.23	11.22
MI-1a	261-262	+64.17	199.53
MI-2a	260-270	+69.02	50.12
MI-3a	270[D]	+43.72	6.31
MII-1b	330-338	+47.31	199.53
MII-2b	250-260	+51.70	6.31
MII-3b	330-340	+47.49	3.55
EI-1a	336-350	+43.07	199.53
EI-2a	276-278	+40.18	7.94
EI-3a	338-340	+35.69	3.55

[D] Decomposed

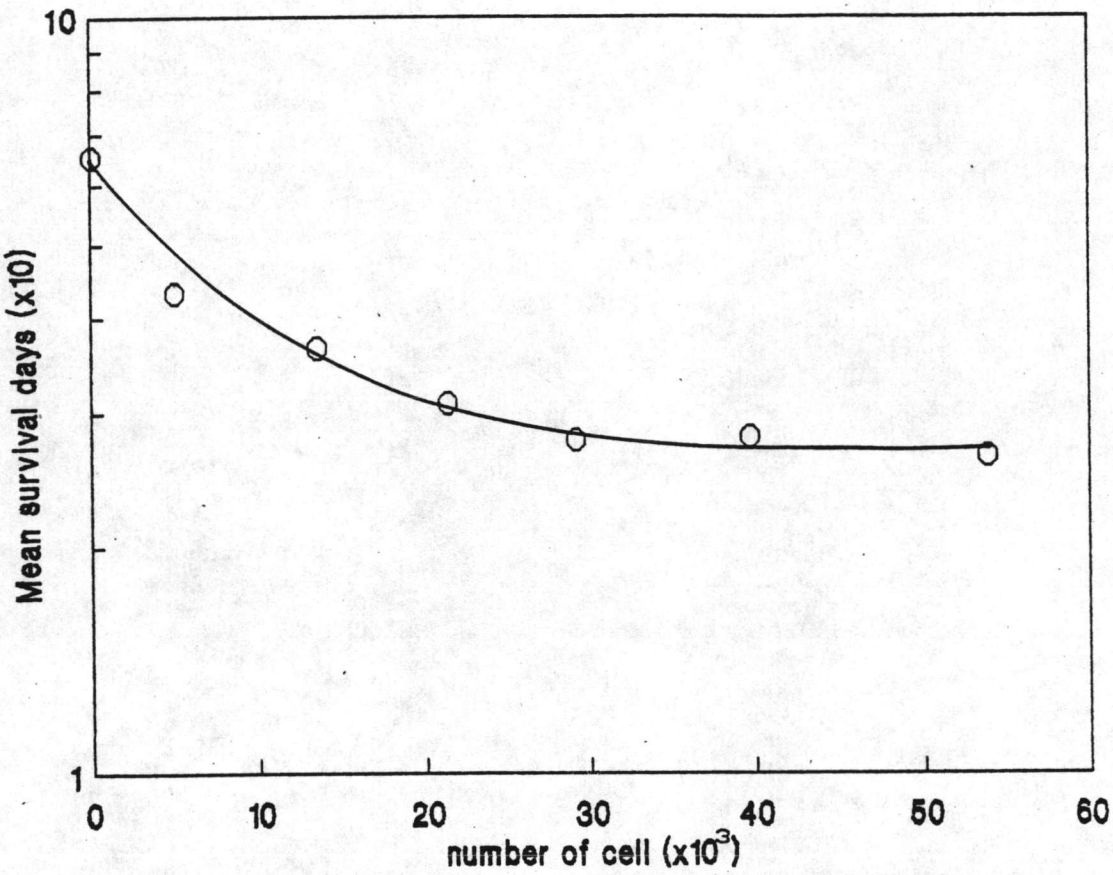


รูปที่ 56 กราฟแสดงมวลโมเลกุลของสารโพลิแซคคาไรด์จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ซึ่งสกัดแยกด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล ทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose และSepharose 6B (จากวิธีข้อ 2.3.2.3)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบอายุของหนู C3H ที่ถูกฉีดเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma บริเวณกล้ามเนื้อขา (intramuscle) โดยใช้จำนวนเซลล์ต่าง ๆกัน

cell suspension %(w/v)	number of cell[a]	Mean survival days	Mortality at 4W
media control	-	65	0/10
2.0	54.1×10^3	26.2±3.4	10/10
1.0	39.7×10^3	28.0±2.5	10/10
0.5	29.2×10^3	29.0±5.1	10/10
0.3	21.4×10^3	30.8±4.7	10/10
0.2	12.1×10^3	35.0±7.5	8/10
0.1	5.0×10^3	43.0±9.0	6/10

[a] จากการย้อมเซลล์ด้วย 0.4 % Trypan blue และนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง hemacytometer



รูปที่ 57 กราฟมาตราฐานแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma (นับด้วยเครื่อง hemacytometer) กับอายุ mean survival days หนู C3H ที่ถูกฉีดเซลล์มะเร็งบริเวณกล้ามเนื้อขา (intramuscle) 0.1 มล./ตัว

เซลล์มะเร็ง2.0 % (w/v) แล้ว 24 ชั่วโมง ให้สารสกัดหยาบละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ที่ความเข้มข้น 500, 800 และ 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว ครั้งละ 0.2 มล./20 กรัมน้ำหนักตัว วันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์0.9% ปริมาตรเท่ากัน แต่ละครั้งและเวลาเดียวกัน เพื่อดูการยืดอายุของหนูทดลอง โดยให้ขนาดความเข้มข้นที่สูงมากพอจะยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดยอนุมานว่าปริมาณเซลล์ดังกล่าวน่าจะใช้ได้สำหรับสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกเห็ด ผลการทดลองตารางที่ 15 ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 800 สลับกับ 500 มก./กก.น้ำหนักตัว

เมื่อลดเซลล์มะเร็งเป็น 0.3%(w/v) ทำการทดสอบประสิทธิภาพ ของการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยใช้สารสกัดหยาบ จากดอก และเส้นใยเห็ด ความเข้มข้น 500 และ 800 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ ฉีดวันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน ส่วนสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sepharose 6B 2 ครั้ง จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ความเข้มข้น 100 มก./กก.น้ำหนักตัว ฉีดทุกวัน เป็นเวลา 21 วัน ผลการทดลอง (ตารางที่ 16)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดหมื่นปี สามารถควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ระยะหนึ่ง โดยวัดขนาดก้อนมะเร็งเฉลี่ย ภายหลังการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งสัปดาห์ที่ 3 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอก จะให้เปอร์เซนต์การยับยั้งสูงที่สุดประมาณ 46 % รองลงมาคือ ในเส้นใยประมาณ 34 % และในอาหารเลี้ยงเส้นใยประมาณ 32 % (ตารางที่ 16 และ รูปที่ 58) การยืดอายุยังไม่ดีเท่าที่ควร จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัด ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ในกลุ่มที่เป็นสารโพลิแซคคาไรด์ มีแนวโน้มดีกว่าในสารสกัดหยาบ

สำหรับการศึกษาในหนูไร้ขน มีปัญหาเรื่องการติดเชื้อทำให้หนูที่เลี้ยงไว้ตายเกือบหมด ไม่สามารถรายงานผลการทดลองได้

ตารางที่ 15 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอลจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ต่อเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma 2.0 %(w/v) โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่ฉีดให้กับหนู มีปริมาตร 0.2 มล/กก. น้ำหนักตัว โดยฉีดเข้าช่องท้องของหนู(intraperitoneally) วันเว้นวัน เป็นเวลา 21 วัน

crude extract(M_0)[b] (mg/kg x dose)	Mean survival days at 5W Mean SD		Prolongation of life-span(%)	Complete regression at 4W
	control	treated		
500x 10	25.8±1.3	24.9±3.2	96.5	10/10
800x 10	24.5±0.7	25.8±1.4	105.3	10/10
800x 1 + 500x 9	24.5±2.6	26.9±3.2	109.6	10/10
1,000x 10	29.5±4.1	18.7±2.8	63.4	10/10

Animal:C3H (8 weeks old)

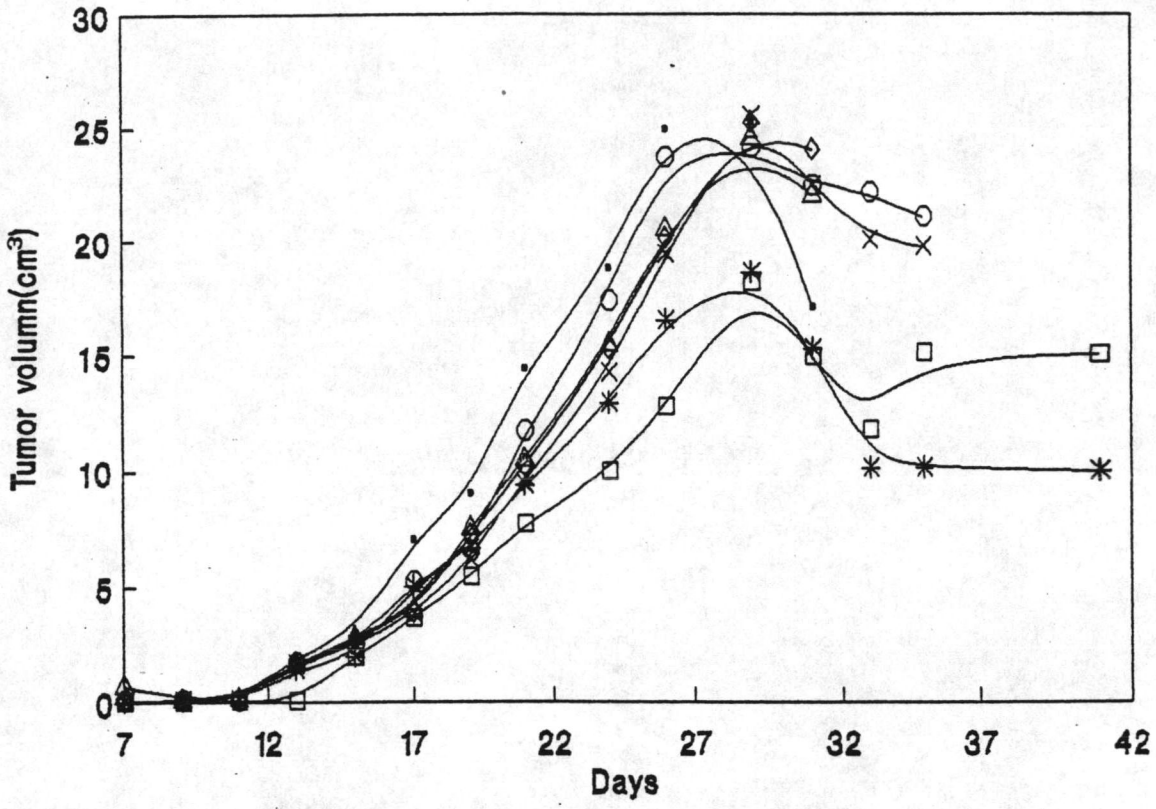
[b] Ethanol precipitation

ตารางที่ 16 การออกฤทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดแยกด้วยน้ำจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ต่อมะเร็งชนิด Fibrosarcoma 0.3%(w/v)

Exptl.group	Tumor size at 3W (cm^3)mean SD	Tumor inhibition ratio(%)	Mean survival days at 5W Mean SD	Prolongation of life-span(%)	Complete regression at 4W	Mortality at 6W
Control	14.38±1.94	0	30.2±1.3	100.0	0/7	7/7
F_O	11.97±2.95	16.76	32.4±2.4	107.3	1/7	7/7
M_O	12.33±3.47	14.23	32.0±1.7	106.0	1/7	7/7
MII	11.72±2.49	18.5	33.3±3.2	110.3	2/7	7/7
FII-1b	7.68±5.33	46.6	35.0±4.2	115.9	4/7	7/7
MII-1b	9.44±4.25	34.4	33.7±4.6	111.6	3/7	7/7
EI-1a	9.69±2.33	32.6	33.8±2.3	111.9	3/7	7/7

Animal:C3H (8 weeks old)

Dose:(i.p.) 100 mg/kg/day x 21



รูปที่ 58 เปรียบเทียบการเจริญของก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma ในหนู C3H กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ปริมาตร 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว กับกลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกและเส้นใยเห็ด ปริมาณ 500 และ 800 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ และสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยง ของเห็ดหมื่นปี

—•— = กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% 0.2 มล./กก.น้ำหนักตัว

—◇— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด (F_0) 0.5 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—△— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (M_0) 0.8 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—○— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพืด MII 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—✳— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพืด MII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

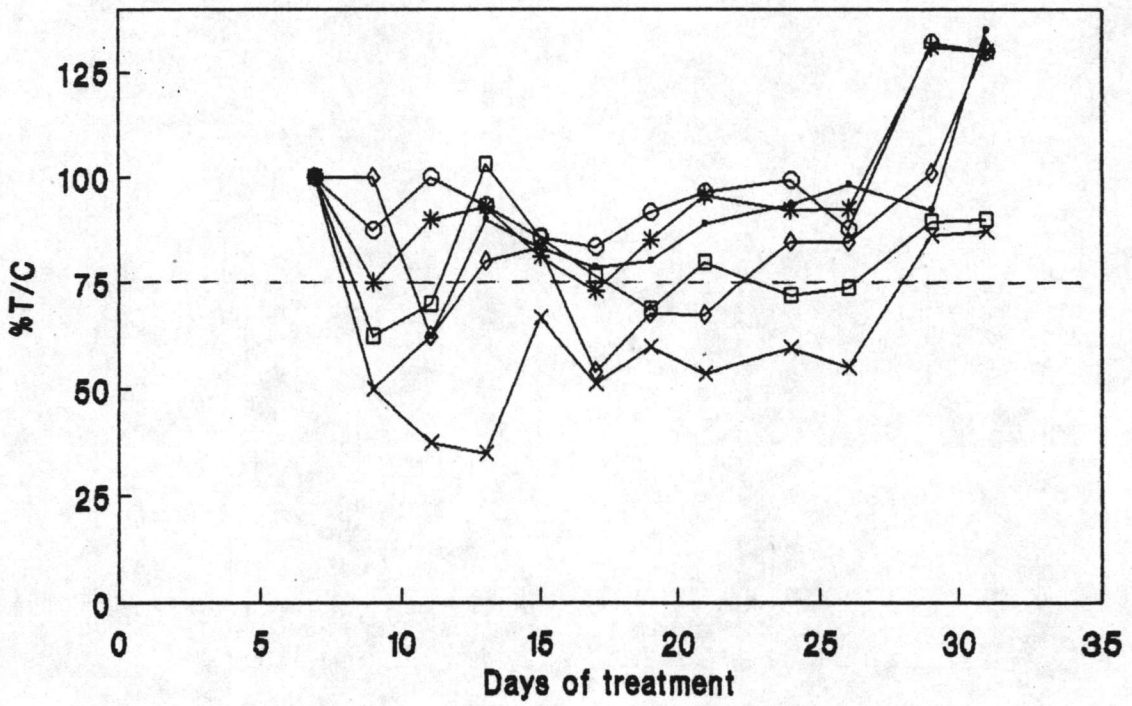
—□— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดพืด FII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—×— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดพืด EI-1a 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของขนาดก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma ในหนู C3H กลุ่มควบคุมจะฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ปริมาตร 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว กับกลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกและเส้นใยเห็ดปริมาณ 500 และ 800 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ และกลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

ระยะเวลา (วัน)	ขนาดก้อนมะเร็ง(ลูกบาศก์เซนติเมตร)*						
	control	F_0	M_0	MII	MII-1b	FII-1b	EI-1a
7	0.1±0.7	0.1±0.6	0.1±0.6	0.1±.05	0.1±0.4	0.1±.05	0.1±0.2
9	0.2±0.1	0.1±0.6	0.2±0.1	0.2±.10	0.2±0.2	0.1±1.0	0.2±1.0
11	0.8±0.3	0.5±0.7	0.7±0.5	0.6±1.1	0.5±1.2	0.3±2.4	0.5±3.1
13	2.0±0.7	1.8±2.3	2.0±3.1	1.8±2.1	1.4±0.6	0.7±0.6	1.6±0.9
15	3.0±1.0	2.5±1.2	2.8±2.3	2.8±2.4	3.1±1.8	2.0±1.4	2.5±1.3
17	7.0±2.0	5.5±3.1	6.0±1.3	5.7±1.8	6.0±2.6	3.6±2.6	3.8±2.2
19	9.0±2.0	7.2±4.1	7.5±4.1	6.6±3.7	6.9±3.2	5.4±3.4	6.1±2.8
21	14.4±2.8	12.8±2.5	13.2±3.1	12.3±2.4	9.9±4.7	7.7±4.9	9.7±3.1
24	16.8±3.2	15.7±5.1	16.2±1.1	16.1±5.1	13.4±4.6	10.0±6.1	14.2±5.6
26	22.9±3.2	22.5±4.8	21.6±1.1	22.7±5.6	16.5±5.9	12.8±1.9	19.4±3.9
29	25.2±6.5	23.2±1.0	22.1±2.4	23.4±1.4	18.6±9.7	21.7±8.2	25.5±3.6
31	17.1	23.1±2.0	22.5±1.4	22.4±1.8	15.3±5.6	14.9±7.4	22.4±2.1
33		23.1	24.0	22.5±1.2	19.5	11.8	21.3±1.1
35		23.0	24.0	21.0	19.5	11.8	19.0
37				21.0	19.5	12.2	18.5
39					19.5	11.5	
41					18.5	12.0	

* จำนวนหนู 7 ตัว/กลุ่มการทดลอง



รูปที่ 59 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ (%T/C) การเจริญของก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma ในหนู C3H กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาตร 0.2 มล./20 กรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*

—•— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด (F_0) 0.5 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—○— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (M_0) 0.8 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—△— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพีค MII 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—□— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพีค MII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

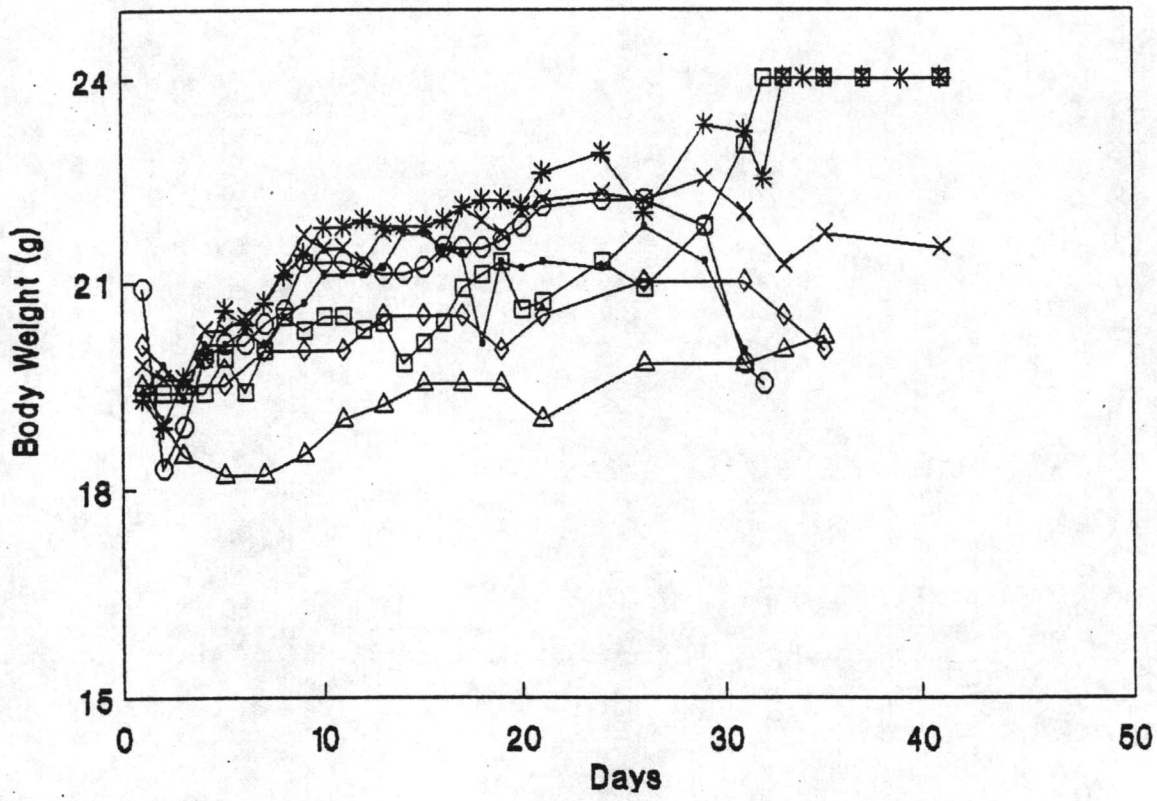
—✳— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดพีค FII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—◇— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดพีค EI-1a 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ (%T/C) การเจริญของก้อนมะเร็ง Fibrosarcoma ในหนู C3H กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาตร 0.2 มล./20 กรัมน้ำหนักตัว และกลุ่มที่ฉีดสารสกัดจากดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี *G. lucidum*

ระยะเวลา (วัน)	%T/C*					
	F_0	M_0	MII	MII-1b	FII-1b	EI-1a
0	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100
9	50	100	100	100	50	100
11	62.5	87.5	75.0	62.3	37.5	62.5
13	90.0	100	90.0	70.0	35.0	80.0
15	83.0	93.3	93.0	103	66.7	83.0
17	78.6	85.7	81.0	85.7	51.4	54.0
19	80.0	83.3	73.0	76.6	60.0	67.8
21	**88.9**	**91.7**	**85.0**	**68.8**	**53.5**	**67.4**
24	93.5	96.4	95.8	79.8	59.5	84.5
26	98.3	94.3	99.1	72.1	55.9	84.5
29	92.1	87.7	92.9	73.8	86.1	101
31	135	132	131	89.5	87.1	131

* %T/C ต้องเท่ากับหรือต่ำกว่า 75 % จึงจะถือได้ว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้



รูปที่ 60 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนู C3H ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ในกลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มทดลองที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์ จากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

—•— = กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% 0.2 มล./กก.น้ำหนักตัว

—◊— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด (F_0) 0.5 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—△— = กลุ่มที่ฉีดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (M_0) 0.8 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

—○— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพีค MII 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—✳— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดพีค MII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—□— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดพีค FII-1b 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

—×— = กลุ่มที่ฉีดสารโพลิแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดพีค EI-1a 100 มก./กก.น้ำหนักตัว

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนู C3H ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ในกลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มทดลองที่ฉีดสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม)*						
	control	F_0	M_0	MII	MII-1b	FII-1b	EI-1a
1	19.1±1.8	19.3±1.2	18.5±1.2	19.3±1.3	20.9±2.6	19.4±2.0	19.8±1.3
2	19.8±1.8	19.5±2.3	19.0±1.2	18.9±2.4	18.2±2.8	19.4±2.1	19.6±1.6
3	19.3±1.9	20.1±1.2	19.1±2.5	19.6±2.1	18.9±2.1	19.1±2.3	19.6±1.3
4	20.1±1.7	21.5±1.1	19.3±2.3	19.9±2.9	19.9±2.5	19.4±2.5	20.3±1.6
5	20.1±2.7	21.1±2.5	20.1±1.1	20.6±2.9	20.1±2.1	19.9±2.4	20.3±1.3
6	20.3±2.4	22.0±1.3	20.1±2.3	20.4±2.7	20.4±2.2	19.4±1.9	20.5±2.1
7	20.1±2.4	22.5±2.4	21.0±1.5	20.7±3.2	20.6±2.1	20.0±2.6	20.7±1.7
8	20.5±2.2	22.5±4.0	21.0±1.1	21.1±3.1	21.3±2.3	20.5±1.8	21.2±1.8
9	20.7±2.1	22.0±2.0	21.0±1.5	21.4±3.2	21.3±1.9	20.3±2.3	21.7±2.2
10	21.1±2.5	22.4±1.5	21.5±2.0	21.8±2.9	21.3±2.3	20.5±1.8	21.5±1.6
11	21.1±2.5	22.6±4.1	21.6±2.3	21.8±2.9	21.2±1.8	20.5±1.8	21.5±1.6
12	21.1±2.1	22.1±2.0	21.5±2.2	21.9±2.9	22.1±2.1	20.3±1.5	21.3±1.6
13	21.2±2.2	23.0±1.1	21.5±1.8	21.8±2.8	22.5±1.1	20.4±1.9	21.7±1.8
14	21.7±2.2	23.1±2.0	22.0±1.2	21.8±2.9	22.0±2.1	19.8±1.4	21.8±1.9
15	21.7±2.6	23.2±3.0	22.5±1.2	21.8±3.1	22.1±1.4	20.1±1.5	21.8±1.9
16	21.5±1.8	23.2±2.0	22.0±0.7	21.9±3.3	22.0±1.3	20.4±1.8	21.4±1.6

* จำนวนหนู 7 ตัว/กลุ่มการทดลอง

ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)*						
	control	F_0	M_0	MII	MII-1b	FII-1b	EI-1a
17	21.4±1.9	23.0±1.2	22.5±4.1	22.1±2.3	22.5±2.1	20.9±1.9	22.1±1.6
18	20.1±1.1	23.5±2.3	22.5±1.8	22.2±3.1	22.4±1.1	21.1±1.9	21.9±1.8
19	21.3±1.5	23.0±1.2	22.5±0.5	22.2±2.5	22.2±2.2	21.3±1.4	21.7±1.6
20	21.2±1.8	23.0±1.6	22.2±1.0	22.1±2.9	22.0±1.3	20.6±1.2	22.0±1.2
21	21.3±1.5	23.1±2.1	22.2±0.5	22.6±2.9	22.3±4.0	20.7±1.3	22.2±1.3
24	21.2±1.5	23.0±1.4	22.5±1.1	22.9±3.2	21.0±1.2	21.3±1.3	22.3±0.9
26	21.3±1.2	23.5±1.6	22.0±1.2	22.0±3.8	21.5±2.0	20.9±1.2	22.2±1.1
29	21.3±1.5	22.5±1.0	22.4±2.3	23.3±3.7	22.1±1.8	21.8±1.2	22.5±0.9
31	22.0±2.6	22.0±1.8	22.6±1.5	23.2±3.0	22.2±2.5	23.0±2.0	22.0±1.5
32	20.0±1.8	22.1±1.5	22.7±2.2	22.5±2.5	22.5±1.5	24.0	22.0
33		23.0±1.1	22.3±1.1	22.5±1.4	22.2±2.0	24	21.25
35		22.8±1.0	22.0±2.3	22.6±1.8	24	24	18.7
37				22.8±2.5	24	24	18.0
39				23.0±2.0	24	24	
41					24	24	

* จำนวนหนู 7 ตัว/กลุ่มการทดลอง

ไม่สามารถรายงานผลการทดลองได้

3.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนูทดลองในขณะได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

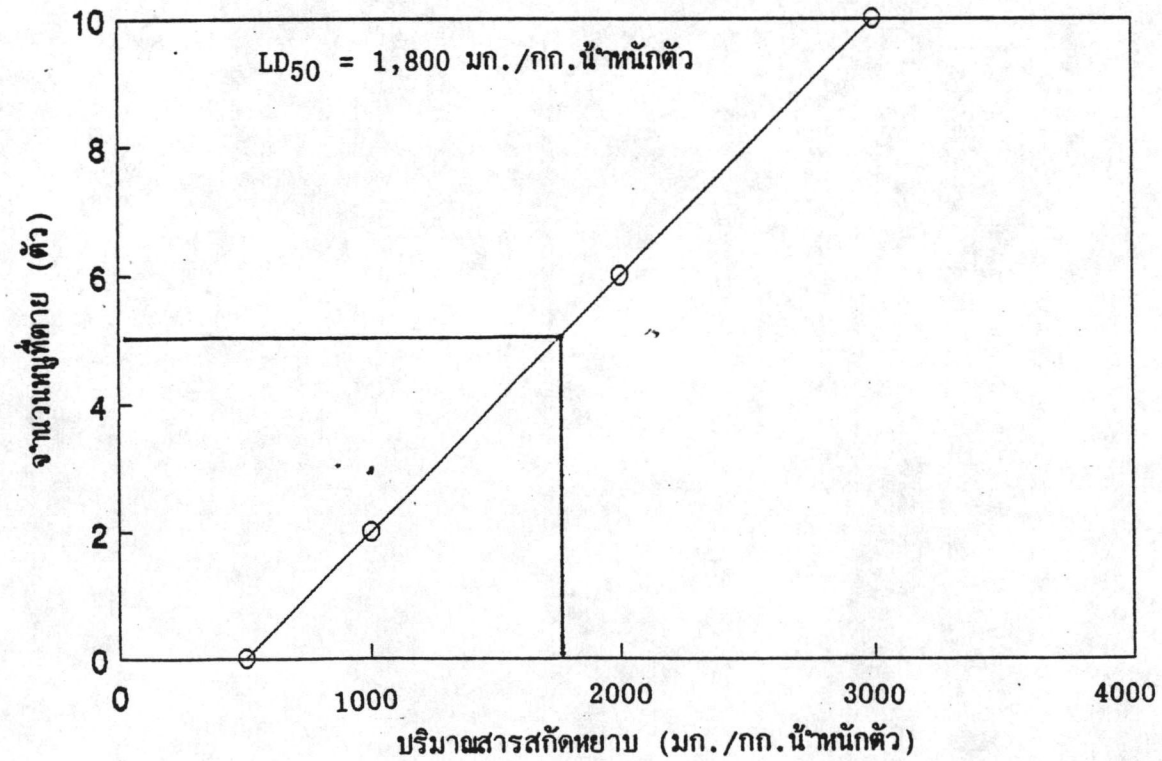
ติดตามเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ และความปกติของหนูทดลองที่ได้รับเซลล์มะเร็ง และเจริญตลอดการทดลอง ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ รวมทั้งกลุ่มควบคุม มีค่าเฉลี่ยประมาณ 20-25 กรัม (ตารางที่ 19 และรูปที่ 60) มีการเปลี่ยนแปลงในระยะแรกที่ได้รับสารสกัดหยาบทั้งจากดอกและเส้นใย ส่วนสารโพลิแซคคาไรด์จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก หรือเกือบไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดการทดลองนาน 40วัน

3.6 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบที่ได้จาก ดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใย ดูปริมาณการตายของหนูเมื่อได้รับสารสกัดหยาบ โดยวิธีฉีดสารสกัดหยาบเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว ดูผลภายใน 24 ชั่วโมง เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ผลการทดลอง (ตารางที่ 20,21,22 และรูปที่ 61,62,63) พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 1,800 , 2,800 และ 3,200 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากดอกและเส้นใย ที่ให้ในปริมาณสูง มีผลทำให้เกิดอาการข้างเคียงที่น่าสนใจคือ หนูแสดงอาการท้องเสีย และเกิดอาการเกร็งในช่องท้อง ซึ่งน่าจะเป็นผลจากฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเอง

ตารางที่ 20 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)โดยการฉีดเข้าช่องท้องของหนู (intraperitoneally) ดูผลภายใน 24 ชม.

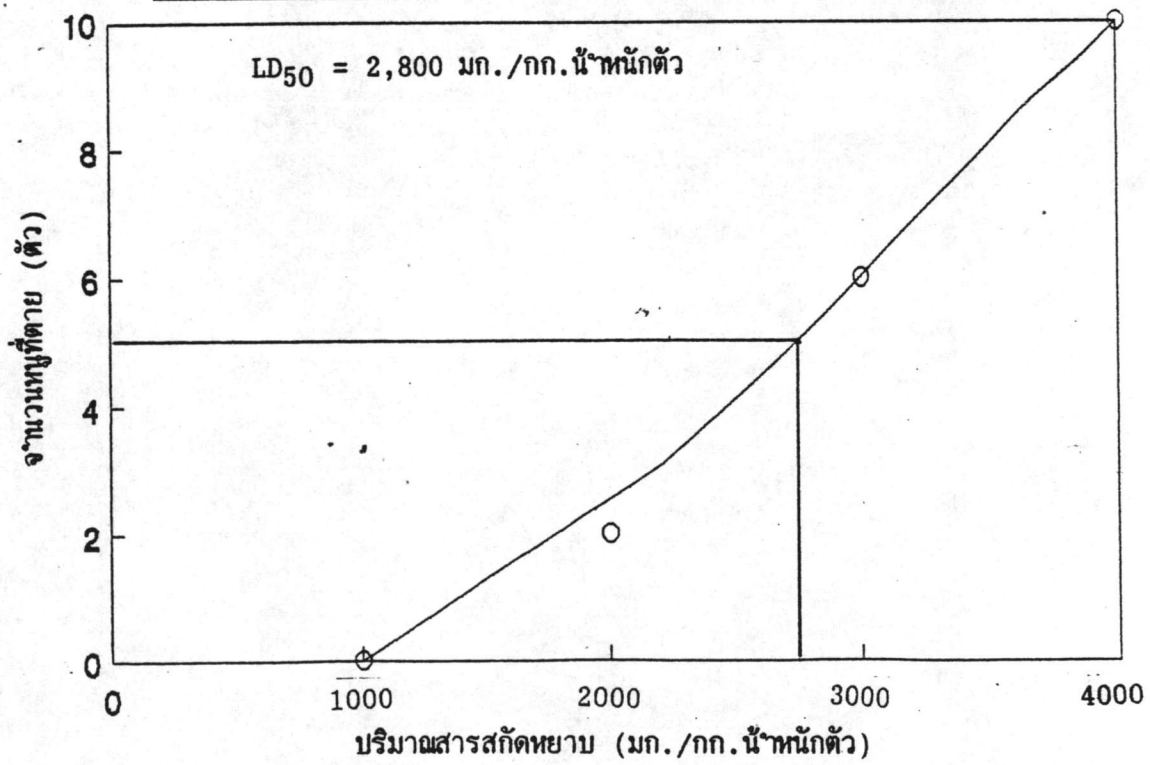
ปริมาณสารที่ให้ (มก./กก.น้ำหนักตัว)	เพศ	จำนวนที่ตาย
500	♀	0/5
	♂	0/5
1000	♀	1/5
	♂	1/5
2000	♀	3/5
	♂	3/5
3000	♀	5/5
	♂	5/5



รูปที่ 61 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) ที่สกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล เมื่อฉีดให้หนูในปริมาณต่าง ๆกัน

ตารางที่ 21 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)โดยการฉีดเข้าช่องท้องของหนู (intraperitoneally) ดูผลภายใน 24 ชม.

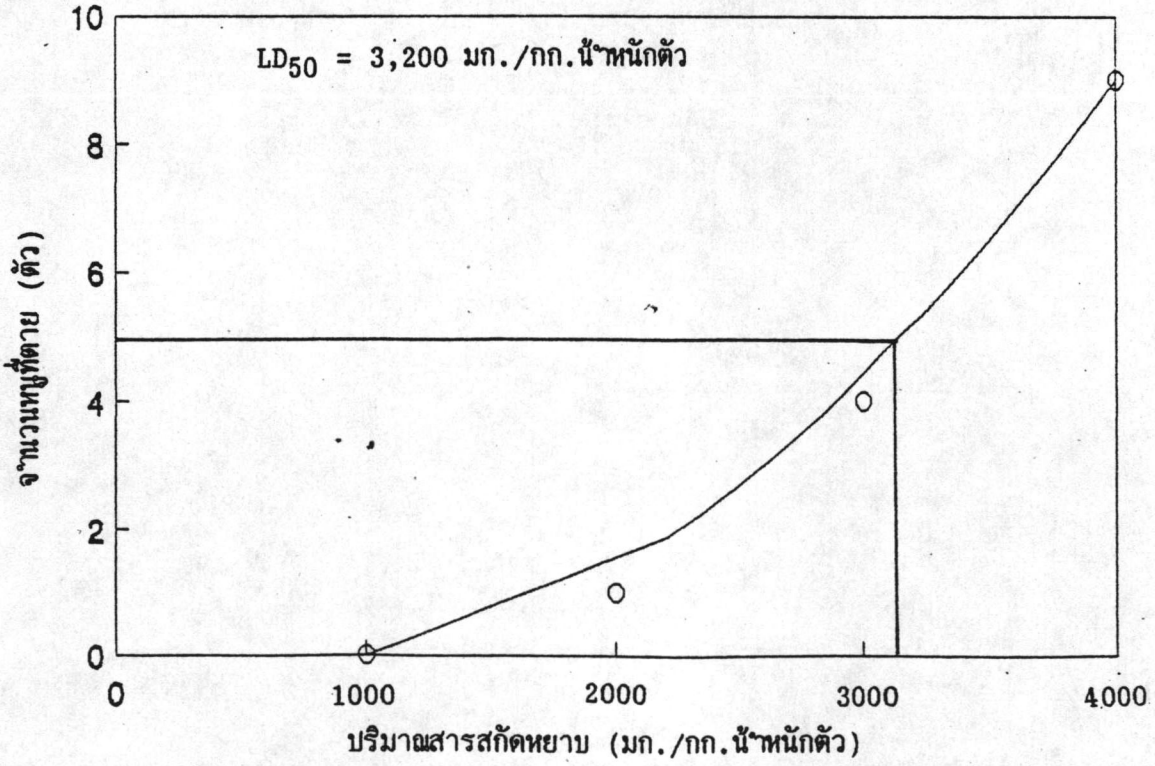
ปริมาณสารที่ให้ (มก./กก.น้ำหนักตัว)	เพศ	จำนวนที่ตาย
1000	♀	0/5
	♂	0/5
2000	♀	1/5
	♂	1/5
3000	♀	3/5
	♂	3/5
4000	♀	5/5
	♂	5/5



รูปที่ 62 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดหมื่นปี(*G. lucidum*) ที่สกัดด้วยน้ำและตกตะกอนด้วยเอทธานอล เมื่อฉีดให้หนูในปริมาณต่าง ๆกัน

ตารางที่ 22 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) โดยการฉีดเข้าช่องท้องของหนู (intraperitoneally) ดูผลภายใน 24 ชม.

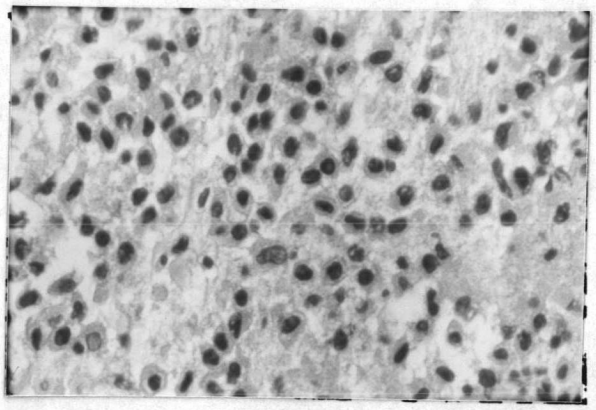
ปริมาณสารที่ให้ (มก./กก.น้ำหนักตัว)	เพศ	จำนวนที่ตาย
1000	♀	0/5
	♂	0/5
2000	♀	1/5
	♂	0/5
3000	♀	2/5
	♂	2/5
4000	♀	4/5
	♂	5/5



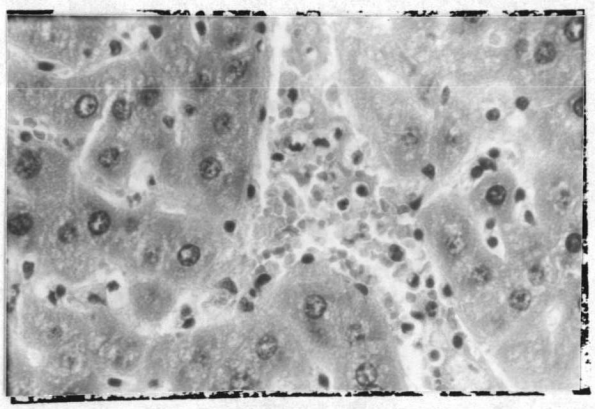
รูปที่ 63 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) ที่สกัดด้วยน้ำ และตกตะกอนด้วยเอทธานอล เมื่อฉีดให้หนูในปริมาณต่าง ๆกัน

3.7 การตรวจสอบเนื้อเยื่อทาง Histopathology

เมื่อทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของหนู เช่น ตับ ไต ปอด และม้าม หลังจากหนู ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง นานประมาณ 30 วัน ทันทีที่ตายจะแช่ 10 % formalin solution เมื่อทำการผ่าดูอวัยวะภายในโดยการสุ่ม และสังเกตุจากลักษณะภายนอก พบว่า บริเวณขอบม้ามจะมีสีคล้ำ และไตจะบวมข้างหนึ่ง นอกจากนี้ ยังได้ทำการตรวจสอบลักษณะของก้อนเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็ง เพื่อเปรียบเทียบ ถึงลักษณะและการเปลี่ยนแปลง ของกลุ่มเซลล์ดังกล่าว หลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง จาก donor ผลการทดลองพบว่า ลักษณะเซลล์มะเร็งที่ได้จากหนู หลังสิ้นสุดการทดลอง ยังมีลักษณะเช่นเดียวกันกับหนูที่เป็น donor(รูปที่ 64) คือมีลักษณะเป็นแบบ Fibrosarcoma และยังตรวจพบกลุ่มของเซลล์มะเร็ง ที่แพร่กระจายไปยังปอด (รูปที่ 65) แต่ไม่พบในอวัยวะภายในอื่น ๆ เช่น ตับ ไต และม้าม



รูปที่ 64 ลักษณะเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ที่ได้จากหนู C3H (กำลังขยาย 400 เท่า)



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 65 ลักษณะเซลล์ปอดของหนู C3H ที่ตรวจพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma หลังจากทำการปลูกถ่ายเซลล์เป็นเวลาประมาณ 30 วัน (กำลังขยาย 400 เท่า)