บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเพาะเห็ดหมื่นปีในวัสดุเพาะขี้เลื่อยไม้ยางพารา พบว่าเส้นใยเห็ดหมื่นปีมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับเส้นใยเห็ดนางรม (หรรษา บุณณพยัคฆ์ และ สุทธพรรณ ตรีรัตน์, 2533) คือใช้เวลาเจริญเต็มถุงวัสดุเพาะภายใน 15 วัน เมื่อบ่มเส้นใยต่ออีก 15 วัน แล้วจึงทำการเปิดดอกเก็บผลผลิตรวมทั้งหมด โดยเฉลี่ยในระยะเวลา 90 วัน ได้ดอกเห็ดสดต่อถุงวัสดุเพาะ 1 กิโลกรัม เพียง 24.2 กรัม คิดเป็นเปอร์เซนต์ได้ 2.42 % ซึ่งโดยทั่วไปการเพาะเห็ดแบบถุง ควรได้ผลผลิตเป็นน้ำหนักเห็ดสดต่อน้ำหนักวัสดุเพาะ 15-20 % หรือมากกว่านี้ จึงจะถือได้ว่าเป็นผลผลิตที่คุ้มทุน แต่มีข้อยกเว้นในเห็ดบางชนิด ที่ให้ผลผลิตต่ำกว่านี้ ซึ่งรวมถึงเห็ดหมื่นปีด้วย (มานพ แก้วกล้า, 2533) Triratana และคณะ(1991) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดหมื่นปี พบว่าสายพันธุ์บางชนิด และวัสดุเพาะเสริมมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ด ดังนั้นหากต้องการเพิ่มผลผลิต เพื่อการพาณิชย์แล้ว จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตดอกเห็ดต่อไปด้วย และควรมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ จากดอกเห็ดที่ใช้วัสดุเพาะเสริมต่าง ๆกัน ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ เหมือนการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวก็เป็นได้

การคัดเลือกอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) สายพันธุ์ G008 โดยทำการเลี้ยงเส้นใยในสภาพนิ่ง (stationary culture) บนอาหารเหลว 3 ชนิดคือ PD, YME และ Molass ซึ่งเป็น natural media ทั้ง 3 สูตร ในขวดทดลอง 500 มล. ปริมาตรของอาหารเท่ากับ 200 มล. เก็บผลการทดลองโดยหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยพบว่า ในสูตรอาหาร PD ที่แปรผันปริมาณกลูโคส (รูปที่ 14) การเพิ่มกลูโคสมากขึ้นค่ามวลของเส้นใยจะเพิ่มตาม กลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะให้การผลิตเส้นใยสูงสุด และให้อัตราการเจริญในระยะ log phase สูงกว่าการใช้กลูโคส 20 และ 40 กรัม/ลิตร ตาม

ลำดับ ถ้าใช้กลูโคส เท่ากันแต่แปรผันปริมาณมันฝรั่ง (รูปที่ 16) มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร จะให้อัตราการเจริญของเส้นใยสูงกว่า 200 กรัม/ลิตร (รูปที่ 15) แต่จะใกล้เคียงกับ 600 กรัม/ลิตร ฉะนั้นในสูตรอาหาร PD จึงควรจะใช้มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร และกลูโคส 60 กรัม/ลิตร (รูปที่ 17) จะได้ค่ามวลสูงสุด จากคุณสมบัติของแร่ธาตุซึ่งช่วยให้มีการเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรีย จึงได้ทดลองนำมาใส่ในสูตร PD แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างของค่ามวลน้ำหนักเส้นใย (รูปที่ 18)

การเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารสูตร YME ที่ใช้น้ำตาลต่างชนิดกัน (รูปที่ 19)จะเห็นว่าในน้ำตาลซูโครส การเจริญจะเข้าสู่ stationary phase เร็วกว่าน้ำตาลฟรุกโตส และกลูโคส ในวันที่ 15 ส่วนน้ำตาลอีก 2 ชนิดจะเข้าช้ากว่า คือวันที่ 20 และ 25 ตามลำดับ แสดงว่ามีการเผาผลาญน้ำตาลซูโครส อย่างรวดเร็ว และมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์ ทำให้การเจริญเติบโตต่ำกว่าน้ำตาล 2 ชนิดแรกถึง 1.5 เท่า ส่วนน้ำตาลฟรุกโตสจะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น แต่การเจริญเติบโตสูงสุดใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคส ฉะนั้นจึงควรเลือกใช้น้ำตาลกลูโคส ในการผลิตเส้นใยเพราะมีราคาถูกกว่า ฟรุกโตสถึง 20 เท่า ทำการแปรผันปริมาณกลูโคสเพื่อหาค่าที่เหมาะสมในการผลิต (รูปที่ 20) พบว่าน้ำตาลกลูโคส 60 กรัม/ลิตร เส้นใยจะเจริญเติบโตสูงสุด ถ้าให้มากกว่านี้การเจริญจะลดลง อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงเกินไป มีผลต่อการนำธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ ซึ่งอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ ในสูตรอาหาร YME ดัดแปลงไม่ใส่มอลท์สกัดเพื่อศึกษาความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหาร YME ดัดแปลงทำการแปรผันปริมาณยีสต์สกัด พบว่า การใช้ยีสต์สกัด 1.0% จะให้การเจริญเติบโตสูงกว่า 0.3 และ 0.6% ตามลำดับ (รูปที่ 21) และจะให้การเจริญเติบโตใกล้เคียงกับในสูตร YME ที่ใช้ยีสต์สกัดเท่ากัน ฉะนั้นในสูตร YME ปริมาณกลูโคส และยีสต์สกัด จึงเป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งกลูโคส 60 กรัม/ลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร จะให้การเจริญเติบโตของเส้นใยสูงสุด

ได้มีรายงานว่าการเพิ่ม แคลเซียมซัลเฟตในสูตร YME จะช่วยให้การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอมดีขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ (Raaskal,1990) อาจช่วยให้อาหารเหลวมี พีเอช

ต่ำลงในระดับพอเหมาะต่อการเจริญของเส้นใย แต่เมื่อนำมาใช้กับเห็ดหมื่นปี กลับไม่ช่วยให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเลย ทั้งนี้อาจขาดสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเห็ดชนิดนี้ แต่มีองค์ประกอบสารอาหารบางอย่างที่เหมาะสม สำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอม (Sone และคณะ,1983) จากการเพิ่มแร่ธาตุบางตัวในสูตร YME คือ แมกนีเซียมซัลเฟต ที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัม/ลิตร ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเส้นใย (รูปที่ 23) อาจเนื่องมาจากความต้องการในการนำไปใช้มีจำกัด การเพิ่มธาตุอาหารจึงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต

กากน้ำตาล (Molass) ถือได้ว่าเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีปริมาณน้ำตาลสูงโดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส เมื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต้องทำการแปรผันความเข้มข้นที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโต (รูปที่ 24) พบว่าที่ความเข้มข้น 7.5 และ 5.0%(v/v) มีการเจริญเติบโตสูงสุดใกล้เคียงกันมาก ถ้าใช้ความเข้นมากกว่านี้จะมีผลต่อการออสโมซิสสารเข้าสู่เซลล์ อาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ จากการทดลองจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 5 % (v/v) โดยแปรผันการเติมกลูโคส ในสูตรอาหาร Molass คือ 0, 2, 4 และ 6 กรัม/ลิตร จะเห็นว่าการเจริญเติบโต ไม่แตกต่างกันมากนักเหมือนในสูตร PD และ YME แสดงว่าการเจริญเติบโต มีขีดจำกัดสำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับหนึ่ง ในการทดลองนี้ Molass ความเข้มข้น 5%(v/v) เมื่อเติมกลูโคส 60 กรัม/ลิตร จะให้ค่ามวลของน้ำหนักแห้งสูงสุด การเพิ่มแร่ธาตุเหมือนในสูตร PD และ YME จะทำให้การเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ช้าลง 10 วัน (รูปที่ 26) และการเจริญเติบโตสูงสุดจะสูงกว่าที่ไม่ใส่แร่ธาตุเล็กน้อย เนื่องจาก Molass เดิมจะมีปริมาณแร่ธาตุน้อยมาก (ภาคผนวก 12) ฉะนั้นการเพิ่มแร่ธาตุที่เพียงพอต่อความต้องการ จึงทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น ส่วน Molass ความเข้มข้น 1 %(v/v) ที่เติมแร่ธาตุในปริมาณเท่ากัน พบว่าการเจริญไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ใส่กับไม่ใส่แร่ธาตุ (รูปที่ 27) จากข้อมูลนี้สามารถยืนยันได้ว่าเส้นใยเห็ดต้องการแร่ธาตุที่เพียงพอจึงสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตให้สูงขึ้นได้ นอกจากนี้ยังต้องการสารอาหารอื่นเพิ่มเติมด้วย

การเติมยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร ในสูตร Molass 5 %(v/v) จะให้การเจริญ

เติบโตสูงสุด 2.25 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อปริมาณอาหารเลี้ยง 200 มล. สูงกว่าชุดควบคุม ประมาณ 0.6 กรัม การให้แร่ธาตุร่วมกับยีสต์สกัด ก็ไม่ทำให้การเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (รูปที่ 28) อาจเนื่องจากในยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร มีปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นเพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตอยู่แล้ว ฉะนั้นการเพิ่มแร่ธาตุลงไปอีก จึงไม่เกิดประโยชน์แต่อย่างใด

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี ในอาหารเหลวสูตร PD และ YME เมื่อใช้กลูโคส 2 กรัม/ลิตร กับ Molass 5%(v/v) จากการวิเคราะห์พบว่า Molass มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 2.8 กรัม/ลิตร มีค่าใกล้เคียงกับ 2 สูตรแรก เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต ซึ่งในสูตร Molass จะมีอัตราการเจริญเติบโตหลังจากวันที่ 10 สูงกว่า PD และ YME (รูปที่ 30) และจะเข้าสู่ระยะ stationary phase วันที่ 15 เร็วกว่าสูตร PD และ YME ที่การเจริญเติบโตจะใกล้เคียงกันและจะเข้าระยะ stationary phase เมื่ออายุ 25-30 วัน (รูปที่ 29)

จากการแปรผันแหล่งอาหารที่ให้การเจริญเติบโตสูงสุด ในอาหารทั้ง 3 สูตรเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันจะเห็นว่า สูตร PD (มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร และ กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) และ YME จะให้การเจริญเติบโตใกล้เคียงกันคือ มีค่ามวลสูงสุดประมาณ 3.2 กรัม ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยง 200 มล. ซึ่งสูงกว่าในสูตร Molass 5 %(v/v) (กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) ประมาณ 0.7 กรัม ที่สภาวะเดียวกัน (รูปที่ 31)

ผลของการทดสอบหาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวพบว่า มีแนวโน้มต่ำลงเมื่อเส้นใยการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจาก ในระหว่างที่มีการเจริญของเส้นใยปล่อย ไฮโดรเจนอิออน(H^+) ออกมาเพื่อแลกเปลี่ยนอิออนบางตัว หรือมีการสร้างกรดบางชนิดออกมา (Lilly and Barnett,1951) pH เริ่มต้นในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ อยู่ระหว่าง 4.0-5.0 จะให้การเจริญเติบโต ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 32) ถ้าค่า pH สูงกว่านี้คือมากกว่า 6.0 ขึ้นไปการเจริญจะลดลง การเติมแร่ธาตุในสูตรอาหาร PD, YME และ Molass พบว่าทำให้ค่า pH ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ไม่เปลี่ยนแปลงมากนักคือไม่เกิน 1 หน่วยพีเอช เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมแร่ธาตุ พีเอชจะลดลงต่ำกว่านี้ อาจเหลือประมาณ 3.7 ซึ่งเชื่อว่าแร่ธาตุที่

เติมลงไปจะเป็น บัฟเฟอร์ให้กับอาหารเลี้ยงเชื้อได้

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 28-34 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิของประเทศในเขตร้อน และสามารถขึ้นได้ดีในธรรมชาติ โดยเฉพาะในประเทศไทย สามารถตรวจพบได้ทั่วทั้งประเทศ (ปรีชา กลิ่นเกสร,2530)

การสกัดแยกสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยน้ำร้อน จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ พบว่า ในการเจริญเติบโตสูงสุดจะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุดด้วย แต่ปริมาณโปรตีนเริ่มลดลง แสดงว่าเส้นใยเริ่มหยุดการเจริญเติบโต มีการสะสมคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น เมื่อปริมาณอาหารที่ถูกใช้เริ่มลดลงจนกระทั่งหมด เส้นใยจะดึงคาร์โบไฮเดรต ที่สะสมไว้มาใช้ ถ้าเก็บในช่วงนี้จะพบว่ามีสารโพลิแซคคาไรด์อยู่น้อย ลักษณะเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำ และตายในที่สุด ฉะนั้นจึงควรเก็บเมื่อเส้นใยหยุดการเจริญเติบโต และมีการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด (รูปที่ 38) จากการทดลองวิเคราะห์สารโพลิแซคคาไรด์ ที่สกัดได้จากเส้นใยในสูตรอาหารต่าง ๆ พบว่าการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอน เช่นเดียวกับการเจริญเติบโต ในสูตร PD (มันฝรั่ง 400 กรัม/ลิตร กับ กลูโคส 60 กรัม/ลิตร) จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด ถ้าเติมแร่ธาตุลงไปด้วยจะทำให้การสร้างสารโพลิแซคคาไรด์ลดลงครึ่งหนึ่ง แต่จะสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า แสดงว่าธาตุอาหารที่เติมลงไปจะช่วยในการสร้างโปรตีนของเส้นใย มากกว่าการสะสมคาร์โบไฮเดรต

ในทำนองเดียวกับสูตร YME จะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด เมื่อใช้กลูโคส 60 กรัม/ลิตร การเพิ่มแคลเซียมซัลเฟต จะทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ลดลงครึ่งหนึ่ง ส่วนการผลิตโปรตีนจะลดลงถึง 3 เท่า จากการเลือกใช้ชนิดของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดพบว่าซูโครสจะให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด ถึงแม้ว่าจะให้การเจริญเติบโตจะต่ำสุดก็ตาม ส่วนฟรุกโตส ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด กลับให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ต่ำสุด เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตในช่วง log phase สูงมาก ทำให้การสะสมสารโพลิแซคคาไรด์น้อยลง ผลผลิตจึงต่ำกว่าน้ำตาลชนิดอื่น

สูตรอาหาร Molass 5 %(v/v) กับกลูโคส 40 กรัม/ลิตร จะให้การผลิตสารโพลิ

แซคคาไรด์สูงขึ้นจากเดิมเกือบ 2 เท่า และมากกว่าการใช้กลูโคส 60 กรัม/ลิตร เล็กน้อย ถ้าคำนวณโดยประมาณ จาก Molass 5 %(v/v) ซึ่งมีน้ำตาลอยู่แล้ว 2.8 % รวมกับที่เติมลงไปอีก 4 % จะมีน้ำตาลรวมทั้งหมดประมาณ 60 กรัม/ลิตร เท่ากับที่ใช้ในสูตร PD และ YME แล้วทำให้ได้สารโพลิแซคคาไรด์สูงสุด การเติมยีสต์สกัดในสูตร Molass 5 %(v/v) ไม่ช่วยให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ส่วนการเติมแร่ธาตุ กลับทำให้มีการผลิตลดลงเกือบ 4 เท่า แต่ถ้าให้ยีสต์สกัดร่วมกับ แร่ธาตุการผลิตจะสูงขึ้นจาก 5.12% เป็น 6.38 % ส่วนการสร้างโปรตีนจะเท่าเดิม แสดงว่าแร่ธาตุมีส่วนในการนำยีสต์สกัดไปใช้ในขบวนการสร้างสารโพลิแซคคาไรด์ให้ดีขึ้น

Sone และคณะ(1985) ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตเส้นใยของเห็ดหมื่นปี เช่น มอลโตส ซูโครส และกลูโคส ที่มีผลต่อการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ พบว่า กลูโคส ให้การผลิตสูงสุด รองลงไปคือ มอลโตส และซูโครส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้ พบว่าประกอบด้วย กลูโคส แมนโนส และกาแลคโตส เหมือนกันแต่ปริมาณที่ผลิตได้ต่างกัน ฉะนั้นการผลิตโดยใช้ โมลาส มีซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก จึงน่าจะใช้ผลิตเส้นใยเห็ดได้ และเชื่อว่าจะสามารถให้ผลผลิตที่เป็นองค์ประกอบ ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเหมือนกัน จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นแล้วว่า สูตรอาหาร Molass สามารถให้ผลผลิตสูงทั้งน้ำหนักเส้นใย และสารโพลิแซคคาไรด์ ราคาผลผลิตของวัตถุดิบที่ใช้ก็ต่ำมากด้วยจึงเหมาะที่จะใช้ผลิตจำนวนมาก แต่ควรมีการศึกษาถึงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ของสารโพลิแซคคาไรด์ ที่ผลิตได้ก่อน และศึกษาถึงวิธีการนำโมลาสมาใช้ให้เกิดประสิทธิภาพอย่างถูกต้อง

ฉะนั้นการพัฒนาการผลิตจึงมุ่งเน้นไปที่การเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว ไม่ว่าจะเป็นองค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตร หรือการควบคุมสภาวะการเลี้ยงต่าง ๆ อาทิเช่น pH , อุณหภูมิ และการให้อากาศ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตทั้งสิ้น จากการศึกษาพบว่าแหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหลักที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ ในการเลือกใช้จึงต้องพิจารณาถึง ชนิด, ปริมาณ และราคา เพื่อให้คุมค่าต่อการผลิต

ในการวิจัยนี้ได้เลือกผลิตเส้นใยในอาหารเหลว PD (ปริญญา รัตนพิมาน,2530)พบว่า

พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถต้านการเจริญ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกคนในหนูไร้ขน ได้อย่างมีนัยสำคัญ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้ และศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ต่อไป

สูตรอาหาร YME จะให้ผลผลิตน้ำหนักแห้ง และสารโพลิแซคคาไรด์ ใกล้เคียงกับสูตรอาหาร PD แต่ราคาวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสูงกว่า ถึงแม้ว่าสูตรอาหาร YME จะไม่ถูกเลือกใช้เพื่อการผลิตจำนวนมากในงานวิจัยนี้ แต่ช่วยให้เราศึกษาถึงผลขององค์ประกอบอาหาร ที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์ได้อย่างดี ทั้งแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ เป็นที่น่าศึกษาว่าถ้าให้มีการเจริญเติบโตอยู่ในระดับหนึ่ง โดยไม่เปลี่ยนแปลงเป็นดอกหรือโครงสร้างอื่น น่าจะทำให้การผลิตสารโพลิแซคคาไรด์สูงขึ้น และใช้เวลาสั้นซึ่งเป็นหัวใจหลักในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

การสกัดแยกสารต้านมะเร็งจากเส้นใย ดอก และอาหารเลี้ยงเส้นใย ด้วยน้ำร้อนติดตามด้วยการ dialysis แล้วตกตะกอนด้วยเอทธานอล ทำให้แห้งด้วยอะซิโตน พบว่าเส้นใยให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากกว่าในดอก เส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเล็กน้อย คือ 3.4%, 3.0% และ 2.9% ตามลำดับ ซึ่งได้ใกล้เคียงกับที่ Miyazaki and Nishigima (1981)ได้สกัดแยกสารจากดอกเห็ดในวิธีที่คล้ายกัน ได้ประมาณ 3.4% เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Anthrone test พบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดมีปริมาณของ คาร์โบไฮเดรตสูงกว่าดอกเห็ด 84.6% สำหรับเส้นใย และ 69.1% สำหรับดอกเห็ด ในอาหารเลี้ยงเส้นใยมี 43.6% เป็นครึ่งหนึ่งจากที่มีในเส้นใย สาเหตุอาจเนื่องจากเส้นใยมีส่วนที่สัมผัสกับอาหารเหลว PD มีประสิทธิภาพในการใช้กลูโคส หรือแป้ง ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ สูงกว่าดอกเห็ดยิ่งไปกว่านั้น อาจมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าด้วย จึงปล่อยออกมานอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงน้อย การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's ในการทดลองนี้ระดับโปรตีนที่วัดได้ในเส้นใย มีค่าใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเส้นใย แต่ต่ำกว่าค่าที่สกัดแยกได้จากดอกเห็ด คือมีค่าเพียง 5.4% ในอาหารเลี้ยงเส้นใย 4.8% ขณะที่ดอกเห็ดมีค่าสูงถึง 21% แสดงให้เห็นว่าดอกเห็ดมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่า ในเส้นใย และอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ด Miyazaki and

Nishijima (1981) สกัดแยกสารจากดอกเห็ดหมื่นปี พบว่ามีค่าสารโพลิแซคคาไรด์ สูงประมาณ 64.5% และโปรตีนประมาณ 21.3%

ในการวิจัยนี้ เมื่อนำสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด และเส้นใยเห็ดหมื่นปี มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose ชะด้วยน้ำกลั่น และตามด้วย 0.1 M $NaHCO_3$ ได้สารประกอบ 2 กลุ่มที่มีประจุต่างกัน ทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยนำไปผ่านคอลัมน์ gel filtration ชนิดต่างๆ อาทิเช่น Sephadex G75, Sephadex G200, Sepharose 4B และ Sepharose 6B เพื่อดูรูปแบบการทำให้บริสุทธิ์ของแต่ละคอลัมน์ และปริมาณผลผลิตที่ได้ (ภาคผนวก 2-8) การเลือก Sephrose 6B เพื่อใช้ในการทดลอง เนื่องจากมีความสามารถในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุลสูง ๆในช่วง $1x10^4$ ถึง $1x10^6$ ได้ดี และความสะดวกในการใช้ คือเตรียมง่าย ใช้ได้นาน นอกจากนี้ยังให้ปริมาณสารที่ออกมา มากพอต่อความต้องการด้วย หลังจากนั้นจึงนำสารกลุ่มที่ไล่ด้วยน้ำไปผ่าน Sepharose 6B จะได้สารโพลิแซคคาไรด์ จากดอกเห็ด 3 พีค เรียงตามลำดับคือ 1.27%, 1.81%, 4.65% จากเส้นใย 7.74%, 5.16%, 6.79% และอาหารเลี้ยงเส้นใย 3.41 %, 3.3 %, 0.83 % ซึ่งมีความบริสุทธิ์โดยเฉลี่ยประมาณ 24 เท่า เมื่อนำสารกลุ่มที่ชะด้วย 0.1 M $NaHCO_3$ จากคอลัมน์ DEAE-cellulose มาทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีข้างต้น จะได้สารโพลิแซคคาไรด์ จากดอก 3 พีค เช่นกัน ประมาณ 13.93% , 10.53% , 11.34% จากเส้นใย 23.65%, 4.04%, 6.11% มีความบริสุทธิ์โดยเฉลี่ยประมาณ 13.2 เท่าจากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าสารโพลิแซคคาไรด์ ที่สกัดแยกได้จากดอกเห็ดกลุ่มแรก พีคที่ 3 จะมีปริมาณสูงสุด ส่วนกลุ่มหลังจะมีปริมาณใกล้เคียงกันในแต่ละพีค และในกลุ่มหลังจะมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ สูงกว่ากลุ่มแรก โดยเฉลี่ยประมาณเกือบ 4 เท่า ตรงกันข้ามกับในเส้นใย สารโพลิแซคคาไรด์ในกลุ่มแรกทั้ง 3 พีค จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่กลุ่มหลังพีคที่ 1 จะมีสูงกว่าอีก 2 พีคที่เหลือประมาณ 4 เท่า และสูงกว่าในกลุ่มแรกประมาณ 3 เท่า สำหรับในอาหารเลี้ยงเส้นใย สารโพลิแซคคาไรด์ในกลุ่มแรก จะมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 3 พีค เนื่องจากในกลุ่มหลังมีปริมาณน้อย เมื่อออกมาจากคอลัมน์ DEAE-cellulose จึงไม่ได้เก็บรวบรวมเพื่อนำมาใช้ต่อไป

จากคอลัมน์ Sepharose 6B ที่ผ่านมา สารโพลิแซคคาไรด์ที่ได้บริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนออกได้หมด จึงนำสารที่ได้เหล่านี้ไปผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B เดิมอีกครั้งหนึ่ง สารที่ได้จะมีปริมาณโพลิแซคคาไรด์ลดลงประมาณ 20% แต่มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น ในดอกเห็ด สารกลุ่มแรกทั้ง 3 พีค จะเหลือประมาณ 1.02 %, 1.45 %, 3.72% จากเส้นใย 6.19%, 4.13%, 5.43% และจากอาหารเลี้ยงเส้นใย 2.73%,2.64%,0.66% ให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 36.2 เท่า ในทำนองเดียวกัน สารในกลุ่มหลังจะมีปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ จากดอกประมาณ 11.4% , 8.46%, 9.07% จากเส้นใย 18.92%, 3.23%, 4.89% ซึ่งลดลงจากเดิมโดยเฉลี่ยประมาณ 20 % แต่ได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเฉลี่ยเกือบ 19 เท่า สารในกลุ่มแรกเหลือโปรตีนอยู่น้อยมาก ส่วนในกลุ่มหลัง ปริมาณโปรตีนเหลือประมาณ 0.1% (ตารางที่ 10,11 และ12)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดแยกได้จะเห็นความแตกต่างของจุดหลอมเหลว จากสารโพลิแซคคาไรด์ในพีคแรก ของทั้งพีคที่ 1 และพีคที่ 2 แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ที่ต่างกัน ในพีคที่ 2 จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าพีคที่ 1 เนื่องจากมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าเกือบ 100 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 13) ซึ่งค่า specific rotation ที่วัดในน้ำกลั่น ความเข้มข้นของสาร 0.005 กรัม/ลิตร จะให้ค่าที่วัดได้ในพีคที่ 2 สูงกว่าพีคที่ 1 เกือบเท่าตัว ค่าการบิดระนาบแสงจะเป็นบวกอยู่ในระหว่าง +32.8 ถึง +66.1 มวลโมเลกุลของสารโพลิแซคคาไรด์ เมื่อเทียบกับกราฟมาตราฐาน dextran (Pharmacia) (รูปที่ 56) จะให้ค่ามวลโมเลกุลของพีคแรก ทั้งพีคที่ 1 และ 2 อยู่ในช่วง 1.25×10^6 ถึง 1.99×10^6 ดาลตัน ส่วนในพีคย่อยของทั้งพีคที่ 1 และ 2 จะมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 6.3×10^4 ถึง 5.01×10^5 ดาลตัน เมื่อเทียบจากเอกสารอ้างอิงของสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำมีค่ามวลโมเลกุล ประมาณ 38,000 ดาลตัน และมีค่า specific rotation เท่ากับ $+36^\circ$ (c=1,น้ำกลั่น) (Miyazaki และคณะ 1981) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากการทดลอง และจะมีโครงสร้างของโมเลกุลเป็น β-(1-3)-D-glucan ซึ่งมีรายงานว่าสามารถให้ผลการออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง sarcoma 180 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ฉะนั้นในการ

ทดลองนี้จึงน่าจะให้ผลการออกฤทธิ์ด้วยเช่นกัน

ในการทดสอบการต้านมะเร็ง Fibrosarcoma โดยการเลือกใช้สารโพลิแซคคาไรด์จากลุ่มหลัง พีคที่ 1 ทั้งในดอก และเส้นใยเห็ด เนื่องจากมีรายงานว่า สารโพลิแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ จะออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ดีกว่าขนาดเล็ก แต่ถ้าต่ำกว่า 10,000 ดาลตัน จะไม่มีผลในการออกฤทธิ์เลย (Maruyama และคณะ, 1989)

Lee และคณะ (1984) ทดลองให้สารสกัดหยาบที่แยกได้จากเส้นใยเห็ด *Ganoderma lucidum* สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ที่ปลูกถ่ายเซลล์ใต้ผิวหนังหนู C3H ได้อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยวิธีการฉีดสารสกัดหยาบ 2 กรัม/กก.น้ำหนักตัว ทุกวันเป็นเวลา 27 วัน นอกจากนี้ ยังสามารถควบคุมจำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ที่ฉีดเข้าเส้นเลือดดำ ทางหาง เพื่อยับยั้งการเกิดโคโลนีของมะเร็งที่ปอด ได้อย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี โดยการวัดขนาดก้อนมะเร็งในสัปดาห์ที่ 3 พบว่ามีผลในการควบคุมการเจริญของเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ช่วงระยะหนึ่ง ในดอกจะให้เปอร์เซนต์การยับยั้งสูงสุด 46% รองลงมาคือ เส้นใย 34.4% และอาหารเลี้ยงเส้นใย 36.6 % การศึกษาโดยดูการรอดชีวิตของหนูพบว่า สามารถยืดอายุของหนูได้ โดยเฉลี่ยกลุ่มควบคุมจะตายหมดเมื่อสิ้นสัปดาห์ที่ 4 ส่วนหนูที่ให้สารสกัดหยาบจะตายหมดในช่วงสัปดาห์ที่ 4-5 ส่วนสารโพลิแซคคาไรด์จะทำให้หนูบางตัวมีชีวิตรอดถึง 41 วัน เนื่องจากเป็นมะเร็งที่รุนแรงทำลายต่อมน้ำเหลืองของหนู เซลล์ไขกระดูก รวมถึงเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อ เมทตาโบลิซึมด้วย และยิ่งไปกว่านั้นยังเป็นมะเร็งที่จี้นได้ดีที่อวัยวะเป้าหมาย คือ ปอด ซึ่งถือได้ว่าเป็นตำแหน่งสำคัญ ยากที่จะควบคุมได้ ดังนั้นการใช้สารที่ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในระยะเริ่มต้น เป็นสิ่งที่จำเป็นในอนาคตถ้าใช้ร่วมกับ การฉายรังสี หรือยาชนิดใหม่ จะช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้พยายามทำการทดลองในหนูไร้ขน เพื่อยืนยันผลการทดลองของ ปริญญา รัตนพิมาน (2535) แต่เมื่อให้สารโพลิแซคคาไรด์ ครบ 21 วัน หนูเกิดการติดเชื้อเนื่องจากห้องเลี้ยงยังไม่ sterile เพียงพอทำให้หนูทดลองตายหมด การที่ผลการทดลองในหนู C3H ให้ผลได้อย่างไม่มีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากชนิดของมะเร็งที่ต่างกัน ซึ่งจะให้ความรุนแรงต่างกันสังเกตุได้

จากอัตราการเจริญของขนาดก้อนมะเร็ง ใน nude mice ที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน ลงใต้ผิวหนัง จะสังเกตุเห็นและเริ่มวัดขนาดของก้อนมะเร็งได้ หลังการปลูกถ่ายประมาณ 30-40 วัน ส่วนมะเร็งชนิด Fibrosarcoma ซึ่งเป็นมะเร็งของหนูเอง ทำการปลูกถ่ายบริเวณกล้ามเนื้อขา จะสังเกตุเห็นและวัดขนาดได้ภายในเวลา 7-9 วัน ซึ่งเร็วกว่ากันเกือบ 5 เท่า ทำให้ยากต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวหนูขึ้นมาต่อต้านเซลล์มะเร็ง ได้ทันเวลา อีกทั้งเป็นมะเร็งของหนูเองจึงขึ้นได้ง่าย ส่วนมะเร็งปากมดลูกนั้นเป็นของคนที่ปลูกลงในหนู ไม่ทุกตัวที่สามารถขึ้นได้และมีระยะเวลาพอที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตัวหนู ให้ควบคุมการเจริญของขนาดก้อนมะเร็งได้และไม่ทำให้หนูนั้นตาย เมื่อทำการผ่าดูอวัยวะภายในต่างๆ ก็ไม่พบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

Lee ได้รายงานต่ออีกว่า มีผู้สามารถสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ ได้จากพืชชั้นสูงหลายชนิด รวมทั้งในเห็ด ไลเคน และแบคทีเรีย ซึ่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้โดยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างกลไกป้องกันขึ้นมา Chihara และคณะ (1969) ได้รายงานว่าในเห็ดหอมมีสาร lentinan ซึ่งเป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด Sarcoma-180 ในหนูได้ โดย lentinan (β-D-glucan) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทาน โดยเกี่ยวข้องกับ T-cell ในเลือดหนูพบว่าเมื่อหนูได้รับ lentinan จะมีผลทำให้ปริมาณ T-cell ในเลือดหนูสูง Mizuno และคณะ (1982) สกัดแยกสาร glucan จากเส้นใยเห็ด *G. applanatum* พบว่ามี 2 แบบ คือ β-D-glucan และ -D-glucan แต่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Sarcoma-180 ในหนูได้จะอยู่ในรูป β-D-glucan การศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี Mizuno และคณะ(1984) พบว่า glucan ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจะอยู่ในรูปβ-D-glucan ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น D-glucan,D-glucoronic acid, D-xylose และ D-mannose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1-3)-link-D-glucosyl อาจมีสาขาเป็น β-(1-6)-link-D-glucosyl มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 450,000-1,050,000 ดาลตัน ส่วน α -D-glucan ไม่มีคุณสมบัติในการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารที่สกัดแยกจากดอก และเส้นใยเห็ดหมื่นปี โดยหา

ความสัมพันธ์ของขนาดก้อนมะเร็งจากค่า %T/C ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ สหรัฐอเมริกา (%T/V < 75%) พบว่าหนู C3H ที่นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต้านมะเร็งทุกกลุ่มจะมีค่า %T/C ต่ำกว่า 75% ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นคือช่วงที่มีปริมาณเซลล์มะเร็งยังน้อยอยู่แต่ไม่สมารถควบคุมทั้งหมดได้ ซึ่งในเวลาต่อมามะเร็งจะโตขึ้นอย่างรวดเร็ว จนไม่สามารถจะควบคุมได้ และหนูที่เป็นมะเร็งชนิดนี้จะตายในเวลาต่อมา (ตารางที่ 19 และรูปที่ 59)

การทดลองให้ผลการควบคุมเซลล์มะเร็งไม่ชัดเจนนัก อาจมีสาเหตุหลายอย่างประกอบกัน ดังนี้

1. สารที่สกัดได้อาจมีความจำเพาะต่อเซลล์

2. ชนิดของเซลล์มะเร็ง(selective effect) มีความจำเพาะต่อสารที่ใช้ยับยั้งซึ่งมะเร็งแต่ละชนิดมีความรุนแรงต่างกัน วิธีที่ใช้ในการยับยั้งอาจต้องการแตกต่างกันด้วย

3. ความทนทานต่อพิษข้างเคียงของสารสกัด

4. การให้สารสกัดน้อยเกินไป ซึ่งการให้ขนาดน้อยทุกวันติดต่อกัน จะไปกดการเจริญของเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันมากกว่าการให้ขนาดสูงแต่พักเป็นระยะๆ

เมื่อทำการศึกษาน้ำหนักตัวหนู C3H พบว่าน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยของหนู ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในช่วงท้ายของการทดลองบางกลุ่มน้ำหนักตัวหนูจะลดต่ำลง สาเหตุเนื่องมาจากหนูบางตัว เกิดการตายขึ้นเนื่องจากมะเร็งเป็นพิษ หรือเกิดอาการแทรกซ้อน เช่น ไตบวมน้ำ ม้ามโต ทำให้น้ำหนักตัวลดลงอย่างมาก และจะตายในเวลาต่อมา

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหยาบจากดอกเห็ด ที่สกัดแยกด้วยน้ำร้อนและตกตะกอนด้วยเอทธานอล มีความเป็นพิษสูงกว่า สารสกัดหยาบจากเส้นใยและอาหารเลี้ยงเส้นใย คือต้องฉีดให้หนูสูงถึง 1,800 มก./กก. น้ำหนักตัว ในดอก ซึ่งความพิษเป็นจะสูงกว่าในเส้นใย และ ในอาหารเลี้ยงเส้นใย ที่ต้องใช้สารถึง 2,800 และ 3,200 มก./กก.น้ำหนักตัวตามลำดับ จึงทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง(LD_{50}) หนูที่ทำการทดลองสามารถทนทานได้ โดยมีอาการข้างเคียง คือท้องเดินเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก การระคายเคืองของทางเดินอาหาร ที่ได้

รับสารแปลกปลอมในปริมาณที่สูง

หลังจากหนูตายจะทำการสุ่ม ผ่าดูอวัยวะภายในพบว่าม้ามจะมีสีดำ ไตจะบวมน้ำ ตรวจพิจารณาเซลล์มะเร็งทาง histopathology พบว่ายังคงเป็นเซลล์มะเร็ง Fibrosarcoma ของหนู และตรวจพบการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปที่ปอด ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายของมะเร็งชนิดนี้ ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แต่ไม่พบในอวัยวะภายในอื่น