รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การจำแนกสายพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophylum commune*) โดยเทคนิคชีวโมเลกุล และการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรผลิตพอลิแซคคาไรด์ รวมถึงศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็ง

Molecular characterization of *Schizophylum commune* strains and utilization of agricultural waste for optimized polysaccharides production including theirs *in vitro* anticancer potentials

โดย

อาจารย์ ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2561

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชื่อเรื่อง : การจำแนกสายพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophylum commune*) โดยเทคนิคชีวโมเลกุลและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรผลิต พอลิแซคคาไรด์ รวมถึงศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็ง

ผู้วิจัย : ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์

สถาบัน : วิทยาลัยนวัตกรรมเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2564

สถานที่พิมพ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนงานวิจัย : 39 หน้า

คำสำคัญ : เห็ดแครง, พอลิแซคคาไรด์, ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ลิขสิทธิ์ : มหาวิทยาลัยรังสิต

บทคัดย่อ

การรวบรวมและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดแครงจำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่า แต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เมื่อจำแนกชนิดของเส้นใยที่รวบรวมได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1-ITS4 ,NS1-NS4 และ NL1-NL4 แล้วเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าตัวอย่างตรงกับลำดับพันธุกรรมของ *Schizophyllum commune* จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงที่อายุ 10 วัน พบว่าสายพันธุ์ธารโตให้ปริมาณสารสูงสุด 1.899 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเส้นใยสด สำหรับสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกากมะพร้าวกับรำข้าวในอัตราส่วน 3:7 ซึ่งเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงสายพันธุ์ธารโต นาน 20 วัน สามารถผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุดคือ 1.068 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสดเส้นใยกับอาหารที่ใช้เลี้ยง นำสารสกัดหยาบของพอลิแซคคา ไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก ได้ในระดับต่ำ (IC50 เท่ากับ 625.11±73.89) และไม่มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (IC50 สูงกว่า 1,000µg/ml)

Title : Molecular characterization of *Schizophylum commune* strains and utilization of agricultural waste for optimized polysaccharides production including theirs *in vitro* anticancer potentials

Researcher : Dr. Hathairat Urairong

Institution : College of Agricultural Innovation and Food, Rangsit University

Year of Publication : 2021

Publisher : Rangsit University

Source : Rangsit University

No. of pages : 39 pages

Keywords : *Schizophyllum commune*, Polysaccharide, Anticancer cell

Copyrights : Rangsit University

Abstract

A total of twelve isolates of split gill mushrooms were collected and isolated. It was found that the growth rate of each pure culture mycelium were diversed. Moreover, each isolate was identified through rDNA using ITS1-ITS4, NS1-NS4, and NL1- NL4 primers. By blasting all nucleotide sequences were matched with *Schizophyllum commune*. Quantitative analyses of polysaccharides from the mycelium, 10-days, were evaluated. Dhan- To strain exhibited the highest ability to produce polysaccharide approximately 1.899 percent of mycelium wet weight. However, the substrate was prepared from coconut residue and rice bran in the ratio of 3:7, which inoculated with the Dhan- To mycelium and incubated for 20 days. It could produced the polysaccharide about 1.068 percent of mycelium wet weight plus substrate. Two cancer cells were treated with the various concentrations of crude polysaccharide. The result found that it was able to inhibit the proliferation of human epidermoid carcinoma cells at a low level (IC50 = 625.11±73.89) and no inhibitory effect on Human lung carcinoma cells (IC50 > 1,000µg/ml).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณวิทยาลัยนวัฒกรรมเกษตรและเทคโนโลยีอาหารตลอดจนกลุ่มงานวิจัยสมุนไพรและการแพทย์ผสมผสาน สถาบันวิจัยมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมือต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้

หทัยรัตน์ อุไรรงค์

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

กรอบแนวคิดในการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

เห็ดแครง 3

การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง 4

การจำแนกสิ่งมีชีวิต 5

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 7

วัตถุดิบ 7

เครื่องมือและอุปกรณ์ 7

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี 8

วิธีการทดลอง 9

แผนการดำเนินงาน 14

บทที่ 4 ผลการทดลอง 15

ผลการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง 15

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยบริสุทธิ์ 17

ผลการจำแนกเชื้อเห็ดแครงในระดับสปีชีส์ (Species) โดยวิธีทางชีวโมเลกุล 18

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงที่รวบรวมได้ 23

ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงเพื่อให้ได้สารพอลิแซคคาไรด์สูงจากวัสดุเหลือใช้
ทางการเกษตร 24

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้ง
ผลการเจริญของเซลล์มะเร็ง 26

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและอภิปรายผล 28

สรุปผลการทดลอง 28

อภิปรายผลการทดลอง 28

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ (ต่อ)

ข้อเสนอแนะ 31

เอกสารอ้างอิง 32

ประวัติผู้ทำวิจัย 36

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ ITS1- ITS4) 19

2. ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ NS1-NS4) 19

3. ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (D1/D2) 22

4. แสดงปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเห็ดแครง 12 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 10 วัน 24

5. ผลผลิตของสารพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อเห็ดแครงที่เลี้ยงบนสูตรอาหารแข็ง ที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 25

6. ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (A549) ได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 26

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญรูป

ภาพที่ หน้า

1. แผนผังโครงสร้างของ DNA ชุดหนึ่งประกอบด้วย 4 ยีน 6

2. เส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ ที่ได้รับจากศูนย์บริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 9 สายพันธุ์ 15

3. เห็ดแครงที่ขึ้นตามธรรมชาติที่เก็บรวบรวมมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในโครงการนี้ 15

4. ลักษณะดอกเห็ดแครงที่เก็บจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ 16

5. ลักษณะดอกเห็ดแครง ที่เพาะเลี้ยงจากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก จาก นราธิวาส นนทบุรี ธารโต และยะลา 16

6. เส้นใยเห็ดแครงไอโซเลทต่างๆ ที่รวบรวมจากศูนย์บริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 6 วัน 17

7. เชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์รวบรวมจาก นนทบุรี นราธิวาส ธารโต และยะลา เจริญบนอาหาร PDA อายุ 10 วัน 18

8. สูตรอาหาร 5 สูตรจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนใส่เชื้อเห็ดแครง (ซ้าย) และเชื้อเห็ดแครงเจริญ 20 วัน (ขวา) 25

9. ฤทธิ์ต้านเซลมะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (A549) ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง 27

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็ง (cancer) เป็นโรคที่มีอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยสูง และมีอุบัติการณ์ของโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ (พ.ศ. 2556-2560) ข้อมูลของสำนักนโยบายและแผนยุทธศาสตร์ ระบุว่าในปี 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คน และเพศหญิง 25,645 คน ซึ่งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศ ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ คิดเป็น 56.38% ของโรคมะเร็งทั้งหมด ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งมีหลากหลาย เช่น ความบกพร่องทางพันธุกรรม (Hassanpour, 2017) และลักษณะการดำเนินชีวิต เช่น อาหารการกิน การสูบบุหรี่ (Anand, 2008) การติดเชื้อบางอย่าง การสัมผัสรังสี โรคอ้วน เป็นต้น

ในปัจจุบันมีผู้ป่วยมะเร็งและประชาชนจำนวนมากหันมาสนใจแพทย์ทางเลือก โดยการใช้สมุนไพรในการบำบัดรักษาร่วมกับการรักษาแผนปัจจุบัน ซึ่งสมุนไพรจำพวกเห็ด ได้รับความนิยมอย่างมากในการใช้เพื่อรักษาหรือเสริมสร้างสุขภาพ เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ เห็ดหัวลิง ฯลฯ ทั้งในรูปแบบสารสกัดบรรจุแคปซูล เป็นเครื่องดื่มแบบบรรจุขวด หรือในรูปแบบชา เป็นต้น

เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยโปรตีน ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส แคลเซียม วิตามิน และเกลือแร่ นอกจากนี้ยังพบว่าในเห็ดแครง มีสารสำคัญกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharide) อาทิเช่น Schizophyllan เป็นต้น ที่ช่วยบำรุงกำลังหรือยาอายุวัฒนะช่วยบำบัดโรคมะเร็ง เนื้องอก ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถพัฒนาเห็ดแครงให้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพได้ (Zhou, 2015; Du, 2017; Liu, 2018) อีกทั้งเห็ดแครงเป็นเห็ดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในธรรมชาติและเพาะเลี้ยงในฟาร์ม

สารสำคัญ Schizophyllan สามารถสกัดได้จากดอกเห็ดแครง เส้นใย และอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง (fermented broth) ดอกเห็ดแครงอาจให้สารสกัด Schizophyllan สูง แต่ขั้นตอนการผลิตดอกเห็ดใช้เวลานานกว่า และอาจต้องฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูได้แก่ หนอนทำลายดอกเห็ด หรือราเขียว ซึ่งอาจปนเปื้อนไปกับขั้นตอนการสกัด ดังนั้น ถ้าหากสามารถสกัดสาร Schizophyllan จากเส้นใยเห็ดแครงที่เพาะเลี้ยงในขวดที่ปราศจากจุลินทรีย์อื่น โดยใช้อาหารแข็ง คาดว่าจะสามารถให้สารออกฤทธิ์ Schizophyllan ที่มีคุณภาพดี นอกจากนั้นการใช้ของเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กาก

มันสัมปะหลัง ฯลฯ มาทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพง จะทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง คุ้มค่ากับการขยายขนาดกำลังผลิต

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. รวบรวม จำแนกสายพันธุ์เห็ดแครง
2. คัดเลือกสายพันธุ์ให้สารพอลิแซคคาไรด์สูง
3. ศึกษาสูตรอาหารแข็ง จากวัสดุ/วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรในการเพาะเส้นใยเห็ดแครงที่สามารถผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูง
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครง ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

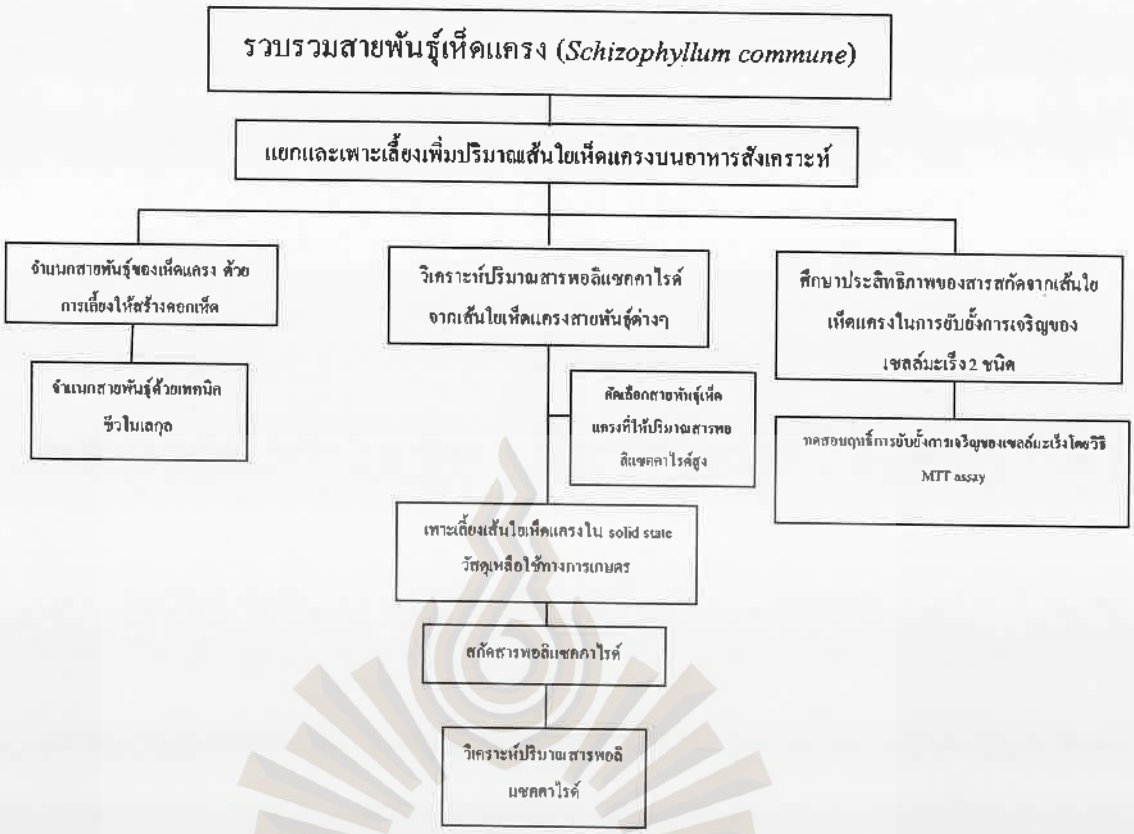
ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ เริ่มจากทำการรวบรวมตัวอย่างเห็ดแครงจากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดและจากสภาพธรรมชาติ และทำการ จำแนกสายพันธุ์ของเห็ดแครงที่รวบรวมได้ ศึกษาการเจริญเติบโตและวิเคราะห์หาปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ในแต่ละสายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้สารพอลิแซคคาไรด์สูงอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ มาศึกษาสูตรอาหารแข็งจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารพอลิแซคคาไรด์สูง ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด

กรอบแนวคิดในการวิจัย

โครงการวิจัย "การจำแนกสายพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophylum commune*) โดยเทคนิคชีวโมเลกุลและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรผลิตพอลิแซคคาไรด์ รวมถึงศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็ง"

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดแครงในระดับดีเอ็นเอ ได้ ทราบถึงสายพันธุ์เห็ดแครงที่สามารถสร้างสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูง รวมไปถึงการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารแข็งที่เป็นวัสดุทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้ที่ราคาถูก เพื่อเพิ่มผลผลิตของ เส้นใยเห็ดแครง และสารพอลิแซคคาไรด์ ทราบฤทธิ์ของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้งกา รเจริญของเซลล์มะเร็ง ถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้ในรูปแบบการตีพิมพ์บทความในวารสารทางวิชาการ เพื่อให้นักวิจัย นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นักวิชาการ และผู้สนใจ ได้นำองค์ความรู้ไปใช้พัฒนาให้มีประโยชน์ในทางคลินิก ในแง่ของการใช้สมุนไพรนี้เป็นการรักษาแบบแพทย์ทางเลือก ใ ช้เพื่อเสริมกับการรักษามะเร็งในปัจจุบัน เป็นการช่วยส่งเสริมการใช้สมุนไพร ทางด้านสาธารณสุขมูลฐาน อาจนำไปสู่การศึกษาและพัฒนาให้ได้สารออกฤทธิ์เพื่อยาใหม่ และเป็นการส่งเสริมด้านเกษตรกรรมในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เห็ดแครง

เห็ดแครง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Schizophyllum commune* เป็นเห็ดที่สามารถใช้รับประทานได้ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น กลูตามีน โปรตีน ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส แคลเซียม และกรดไขมัน (Adejoye, 2007) นอกจากนี้พบว่าในเห็ดแครงมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายกลุ่ม เช่น สารกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ หรือ polysaccharide (Limin, 2012; Zhang, 2013; Sutivisedsak, 2013) โดยสารสำคัญในกลุ่มเบตากลูแคน (β-Glucan) มีชื่อว่า ชิโซฟิลแลน (schizophyllan)

Schizophyllan จัดเป็นสารสำคัญในเห็ดแครงในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเป็นสาร Non-ionic มีลักษณะลื่นคล้ายเจลลี่ (jelly like) สามารถละลายน้ำได้ มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) เป็นสารพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า (Okazaki, 1995; Kitamaru, 1996) มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ช่วยในการรักษาเนื้องอก โรคมะเร็ง (Daba, 2003; Zhong, 2013; Mirfat, 2014; Zhou, 2015; Du, 2017) มีการนำมาใช้เป็นยาในการรักษามะเร็งปากมดลูก (Mayell, 2001) สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ โดยการกระตุ้นการหลั่งของไนตริกออกไซด์ และกระตุ้นการแบ่งตัวของทีเซลล์ (T-cell) ในหนูทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งเต้านมในหนูทดลองได้ (Zhong, 2015) อีกทั้งต้านเซลล์มะเร็งชนิด Sarcoma 180 ascite cells ในหนูทดลองได้ และยังออกฤทธิ์ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นการแบ่งตัวของ lymphocyte (Hobb, 1996)

Miyasaki et al. (1995) ทำการศึกษาโดยให้สาร schizophyllan ที่เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ร่วมกับการใช้รังสีรักษาในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ใช้รังสีรักษาเพียงอย่างเดียว ทำการศึกษาเป็นเวลา 5 ปี โดยวัดผลจากจำนวน T-lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย พบว่าผู้ป่วยที่ให้ schizophyllan ร่วมกับรังสีรักษา มีจำนวน T-lymphocyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ให้รังสีรักษาเพียงอย่างเดียว Chung et al. (2001) ทำการทดสอบสารสกัดหยาบด้วยน้ำร้อนจากเห็ด *Ganoderma lucidium* โดยในสารสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์ 1 ไมโครกรัม พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้ แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อเซลล์ปอดปกติ และเมื่อทำการบ่มสารสกัดหยาบร่วมกับ human T cell line ที่เป็นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เป็นเวลา 4 วัน พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณ T cell ได้ จาก 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบดังกล่าวสามารถกระตุ้นการทำงานของ T cell ได้ นอกจากนี้ Nie et al. (2006) ได้ทำการศึกษากลูแคน

ซัลเฟต (glucan-sulfate) ที่เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งแยกได้มาจากเส้นใยของ *Grifola frondora* โดยนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ที่เป็นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าสารมารถกระตุ้นการสร้างเซลล์มาโครฟาจได้ นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มโปรตีน (protein) (Han, 2005; Chumkhunthod, 2006) และสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) (Mirfat, 2010; Hui-Min, 2016) เป็นต้น

2. การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง

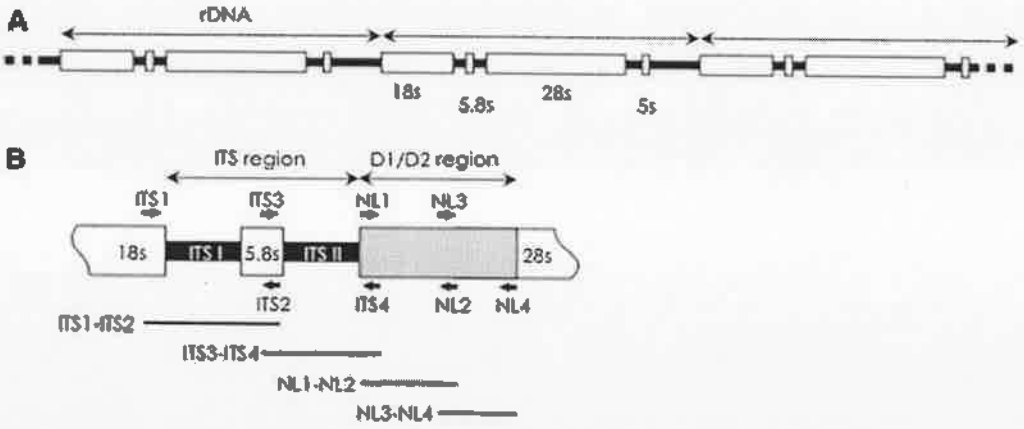
การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง โดยเห็ดแครงนั้นสามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มักขึ้นตามขอนไม้ที่เปียกชื้น นับเป็นเห็ดที่มีความหลากหลาย ทางสายพันธุ์ในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบว่า เห็ดแครงแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตของเห็ดแครงต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของขอนไม้แต่ หากเพาะเลี้ยงในฟาร์ม อัตราการเจริญเติบโตของเห็ดแครงก็จะต่างกัน เนื่องจากเทคนิคการเปิดก้อนและชนิดของวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Preecha, 2015; Nasreen, 2015; Dasanayaka, 2017) ทางเลือกของการวิจัยจากเห็ดคือการใช้เส้นใยสร้างสารสำคัญ ซึ่งเส้นใยนั้นสามารถแสดงลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ได้ และสามารถให้สารสำคัญชนิดเดียวกับดอกเห็ด อีกทั้งยังประหยัดระยะเวลาและสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในสภาวะปลอดเชื้อ (Muruke, 2002; Jung-ki, 2005; Sminou, 2011; Teoh, 2014; Krupodorova, 2015) Rau et al. (1992) ได้รายงานว่า อาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงที่ให้ผลผลิต Schizophyllan ประกอบไปด้วย Glucose -30, Yeast extract-1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.5, KH_2PO_4 -1 และ pH ที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ 5.3 Kumari et al. (2008) ทำการเลี้ยงเส้นใยในอาหาร 2 สูตรตามแบบ Rau, 1997 และ Steiner, 1986 พบว่าอาหารสูตรของ Rau ที่ประกอบด้วย Glucose -30, Yeast extract-1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.5, KH_2PO_4 -1 (หน่วยกรัม ในน้ำ 1 ลิตร) สามารถสร้างสารชิโซฟิลแลนที่สกัดได้จากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุดที่ 1.62 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารชิโซฟิลแลน พบว่าแหล่งคาร์บอน ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือซูโคส (sucose) รองลงมาคือ กลูโคส (Glucose) แหล่งไนโตรเจนที่เป็นออแกนิค ได้แก่ Beef extract ให้ผลผลิตชิโซฟิลแลนสูงสุด และที่ pH 6.0 ดีที่สุดในการสร้างสารชิโซฟิลแลนด์ (Kumari, 2008) Joshi et al. (2013) ได้ทำศึกษาปัจจัยในการเจริญของเส้นใยเห็ดแครงและการผลิตสาร exopolysaccharide พบว่าที่ pH 5.3 จะให้สาร exopolysaccharide สูงสุด และที่ pH 6.0 จะให้ปริมาณเส้นใยสูงสุด แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือไซโลส (xylose) และรองลงมาคือกลูโคส (glucose) และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Joshi, 2013) ต่อมา Jamshidian et al. (2016) ได้ทำการศึกษาวัสดุจากภาคการเกษตรที่เป็นที่มีต้นทุนต่ำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเห็ดแครงเพื่อได้สารชิโซฟิลแลนด์สูงพบว่า Date syrup จะให้

ปริมาณสารชิโซฟิลแลนด์สูงสุด ในขณะที่ malt waste จะให้ปริมาณเส้นใยสูงสุด และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ สารสกัดยีสต์ผสมกับเปปโทน

3. การจำแนกสิ่งมีชีวิต

การจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ บาร์โค้ด คือการใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ ที่มีความผันแปรสูง ระบุชนิด จำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เหมือนบาร์โค้ดที่ระบุรายการสินค้า ในทางปฏิบัติ อาจต้องใช้ส่วนของดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งตำแหน่งประกอบกัน ช่วยให้สามารถพิสูจน์ทราบว่าจตัวอย่างที่สนใจศึกษามีความถูกต้องตรงตามสายพันธุ์หรือไม่

ไรโบโซม (ribosome) เป็นโครงสร้างที่จำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วย ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RND; rRNA) และไรโบโซมอลโปรตีน (ribosomal protein) ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตมีไรโบโซมขนาด 70S ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ large subunit 50S (ประกอบด้วย 5S rRNA และ 23S rRNA รวมกับโปรตีนประมาณ 34 ชนิด) และ small subunit 30S (ประกอบด้วย 16S rRNA รวมกับโปรตีน 21 ชนิด) ส่วนสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตไรโบโซมจะมีขนาด 80S ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยคือ large subunit 60S (ประกอบด้วย 5S rRNA, 5.8 rRNA และ 28S rRNA รวมกับโปรตีน 49 ชนิด) และ small subunit 40S (ประกอบด้วย 18S rRNA รวมกับโปรตีนประมาณ 33 ชนิด) โดยข้อมูลลำดับเบสที่ถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้และจำแนกคือข้อมูลในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เนื่องจากพบมากในเ ซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และค่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ยีนมีรหัสสำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิดต่างๆ ในส่วนของบริเวณ internal และ external transcribed spacers (ITS และ ETS) เป็นบริเวณที่ไม่ใช่ยีน โดย ITS จะอยู่ตำแหน่ง upstream (ITS1) และ downstream (ITS2) ของยีน 5.8S rDNA ซึ่งเป็นส่วนที่มีความผันแปรสูง (variable region) จึงสามารถนำบริเวณนี้มาใช้ในการแยกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงในระดับ สปีชีส์เดียวกันได้ (Guarro, 1999)



รูปที่ 1 แผนผังโครงสร้างของ DNA ชุดหนึ่งประกอบด้วย 4 ยีนได้แก่

(A) 18s DNA, 5.8 s rDNA, 28s rDNA และ 5s rDNA มีการซ้ำกันหลายชุด

(B) แสดงบริเวณ ITS และ D1/12 ซึ่งมี universal primer ITS - ITS4, NL1- NL4

ที่มา: Horisawa et al. (21013)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

เห็ดแครง (Schizophyllum commune)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องระเหยสารภายใต้ความดันต่ำ (Rotary evaporator)

2.2 เครื่อง Lyophilizer (Freeze Dryer)

2.3 เครื่อง Magnetic Stirrer

2.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด 5 ตำแหน่ง

2.5 Ultrasonic Bath

2.6 ตู้ปลอดเชื้อ (biohazard) สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์มะเร็ง

2.7 CO_2 Incubator

2.8 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope พร้อมกล้องถ่ายรูป

2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)

2.10 เครื่อง micro plate reader

2.11 Water Bath

2.12 Vortex Mixer

2.13 Incubator Shaker

2.14 Micro plate shaker

2.15 Spectrophotometer

2.16 Thermal cycle

2.17 Petridish

2.18 Flask

2.19 PCR Plate

2.20 96 Well Plate

2.21 Filter Paper No.1 Whatman

2.22 ขวดเลี้ยงเส้นใย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

3.1 Agar

3.2 Potato Dextrose Agar

3.3 Potato Dextrose Broth

3.4 Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3.5 Minimum Essential Medium (MEM)

3.6 -Hexa-Decyltrimethylammonium Bromide

3.7 Tris-Base

3.8 Sodium Chloride

3.9 Hydrochloric acid

3.10 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

3.11 Chloroform

3.12 RNaseA

3.13 Ethanol

3.14 DNA Taq Polymerase;

3.15 dNTPs

3.16 Primer

3.17 Antibiotic

3.18 Phosphate-Buffered Saline

3.19 Dimethyl Sulfoxide Solvent (DMSO)

3.20 MTT assay kit

3.21 Trypsin EDTA

3.22 Fetal Bovine Serum

3.23น้ำกลั่น (Distilled water)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

4. วิธีการทดลอง

4.1 การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในประเทศไทย

ทำการรวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแครงโดยการทำหนังสือขอไปที่ศูนย์เก็บรวบรวมและอนุรักษ์งานบริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร รวมถึง การออกไปสำรวจ รวบรวมดอกเห็ดแครงที่ขึ้นบนไม้ยางพาราหรือไม้เนื้อแข็งอื่นๆที่ตายแล้วในสภาพธรรมชาติ โดยเฉพาะทางภาคใต้ ในฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงที่มีความชื้นในบรรยากาศเหมาะสม เมื่อได้ดอกเห็ดแครงสดมาแล้วจะทำการตัดแต่งดอกเห็ดแล้วนำไปล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% เป็นเวลานาน 3 นาที ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกอีกครั้งด้วย Chlorox ความเข้มข้น 5% นาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อีกจำนวน 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง จากนั้นตัดดอกเห็ดให้มีขนาด 0.2 ตารางเซนติเมตร วางบนอาหาร PDA ทั้งหมดทำในสภาพปลอดเชื้อ (Aseptic condition) เมื่อเส้นใยเจริญแล้วจึงย้ายเส้นใยเห็ดแครงลงในจานอาหาร PDA จานใหม่ และอีกส่วนเก็บในหลอดที่มีอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ศึกษาต่อไป สำหรับเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดอกเห็ดแครงที่ขึ้นในสภาพธรรมชาติจำเป็นต้องมีการพิสูจน์ว่าเส้นใยของเชื้อที่แยกบริสุทธิ์ได้เป็นเชื้อเห็ดแครงจริงโดยนำเส้นใยที่แยกบริสุทธิ์ที่ได้นี้ไปเพาะเลี้ยงในถุงที่มีอาหารสำหรับสร้างดอกเห็ดเป็นเวลา 20 วัน หรือจนเส้นใยเจริญเต็มถุงจึงกรีดถุง ดอกเห็ดจะขึ้นตามแนวรอยกรีดซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าเส้นใยที่แยกได้เป็นเส้นใยของเชื้อเห็ดแครงจริง

4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยบริสุทธิ์ของเชื้อเห็ดแครง

นำเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้รับจากงานบริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตรและเส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ที่แยกได้จากงานทดลองนี้เลี้ยงในอาหาร PDA เมื่อเชื้อเจริญได้ 5 วันจึงทำการเจาะเชื้อที่เจริญบนอาหารด้วย Cork Borer แล้วนำไปวางไว้กลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA อยู่ เมื่อเชื้อเห็ดแครงเจริญแล้วทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่ระยะเวลา 6 วันและบันทึกจำนวนวันที่เส้นใยเจริญเต็มจานอาหาร จากนั้นนำเส้นใยส่วนหนึ่งไปทำการสกัด DNA เพื่อการจำแนกหรือระบุชื่อวิทยาศาสตร์

4.3 การจำแนกเชื้อเห็ดแครงในระดับสปีชีส์ (Species) โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อเห็ดแครง

เลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดแครงที่รวบรวมได้บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน แยกเส้นใยใส่โกร่งที่มี Extraction Buffer 2% (w/v) จากนั้นใส่สาร CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร (100mM Tris-HCl, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, pH 8.0) บดเส้นใยให้ละเอียด แล้วดูดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม

Chloroform:Isoamyl Alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบน ใส่หลอดใหม่ เติม สาร 5M KoAc ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสาร Isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสาร Ethanol ความเข้มข้น 70% จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วน น้ำใสทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมสารTE Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสาร RNase A (ความเข้มข้น 10mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ Agarose Gel ความเข้มข้น 0.8 % กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที แล้ วนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

4.3.2 การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ และการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอ ทั้ง 12 ตัวอย่าง ที่ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณแล้ว ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เทคนิค PCR จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งหมดในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ได้แก่

1) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ
   ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
2) NS1 (5'- GTAGTCATATGCTTGTCT C -3') และ
   NS4 (5'- CTTCCGTCAATTCCTTTAAG -3')
3) NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3') และ
   NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3')
4) EF1-983F (5'- GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT -3') และ
   EF1-2218R (5'- ATGACACCRACRGCRACRGTYTG -3')
5) RPB2-5F (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG -3') และ
   RPB2-7R (5'- CCCATWGCYTGCTTMCCCA -3')

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาตร25 ไมโครลิตรโดยใช้เทคนิค PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้คือ นำดีเอ็นความเข้มข้น 200 นาโนกรัม ผสมกับไพรเมอร์ Forward และ Reverse ของแต่ละคู่ ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล) dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร

(ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล) Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 1 U) และ 10 X PCR Buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร นำส่วนผสมข้างต้นใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) ที่ตั้งโปรแกรม ดังนี้โดยมีปริมาณสารทั้งหมด 25 ไมโครลิตร

1) ขั้นตอน Predenature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ
2) ขั้นตอน Denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3) ขั้นตอน Annealing อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที
4) ขั้นตอน Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
5) ขั้นตอน Final Elongation อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

รวมปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 30 รอบ จากนั้นตรวจผลการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis แล้วนำผลผลิต PCR ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ทำ PCR ทั้งสองทิศทาง นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความใกล้ชิดหรือความเหมือนกับข้อมูลเพื่อจำแนกเชื้อเห็ดแครงในระดับสปีชีส์ ในฐานข้อมูลสาธารณะ GenBank ด้วยวิธี Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

4.3. การวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง

4.3.1 การสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ จึงนำเส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการรวบรวมในการทดลองนี้เลี้ยงในอาหาร PDA จำนวน 5 วันใช้ Cork borer เจาะเส้นใยบริเวณขอบที่กำลังเจริญเติบโตนำไปวางไว้กลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีแผ่นกระดาษแก้วหรือเซลโลเฟนวางไว้บนอาหาร PDA วางจานอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้องจนครบ 10 วัน จากนั้นแยกเส้นใยเห็ดแครงแต่ละสายพันธุ์จากอาหารโดยใช้ปากคีบ(forcept) คีบเส้นใยที่ขึ้นสานกันเป็นแผ่นบนกระดาษแก้วโดยไม่ยึดติดกับอาหารที่ใช้เลี้ยง นำมาสกัดสารกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีของ Suwanno et al. (2005) โดยใช้เส้นใยเห็ดแครง จำนวน 1 กรัม เติมกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางให้เหลือเฉพาะส่วนน้ำใส (บีบออกมาให้ได้มากที่สุด) แล้วจึงทำการตกตะกอนสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย EtOH โดยใช้อัตราส่วน 1:1 v/v ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 7000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอนของสารสกัดหยาบ (crude) พอลิแซคคาไรด์ นำตะกอนที่ได้แช่ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dry

4.3.2 นำสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดแครงแต่ละสายพันธุ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี phenolic-sulfuric colorimetric (ดัดแปลงจาก Dubois et al., 1956) โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีการวิเคราะห์มีดังนี้คือ

นำสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดแครงแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Eppendorf tube เติม 1 มิลลิลิตรของฟีนอลที่เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และเติม 1 มิลลิลิตร ของกรดซัลฟูริกเข้มข้น เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส โดยเตรียมกราฟมาตรฐานปริมาณกลูโคสความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธีเดียวกับข้างต้นการวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดแครงที่ให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์สูงสุด สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป

4.4 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงเพื่อให้ได้สารพอลิแซคคาไรด์สูง จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

4.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงที่ให้สารพอลิแซคคาไรด์สูงบนอาหาร PDA โดยใช้ Cork Borer เจาะเส้นใยเห็ดแครงบริเวณรัศมีรอบนอก 4 ชิ้น ย้ายลงในขวด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว SPBD (มันเทศ 250 กรัม เปปโตน 1 กรัม วิตามินบี 6 0.5 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 1.3 กรัม เด็กโตรส 20 กรัม) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ตั้งบน Orbital Shaker โดยใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

4.4.2 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี (สูตรอาหาร)ๆละ 5 ขวด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ข้าวฟ่าง : รำข้าว อัตราส่วน 2:8

กรรมวิธีที่ 2 ซังข้าวโพด : รำข้าว อัตราส่วน 2:8

กรรมวิธีที่ 3 ซังข้าวโพด : รำข้าว : ข้าวกล้อง อัตราส่วน 2:6:2

กรรมวิธีที่ 4 ซังข้าวโพด : รำข้าว : กากถั่วเหลือง อัตราส่วน 2:6:2

กรรมวิธีที่ 5 กากมันสัมปะหลัง : รำข้าว อัตราส่วน 4:6

กรรมวิธีที่ 6 กากมะพร้าว : รำข้าว อัตราส่วน 3:7

โดยที่ทุกกรรมวิธีปรับให้มีความชื้น 60% หลังผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ไป vortex แล้วดูดหัวเชื้อปริมารต 5 มิลลิลิตร ใส่ในทุกกรรมวิธีที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 30 กรัมต่อขวด (5 ขวดต่อ 1 กรรมวิธี) เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงจนครบ 20 วัน จึงนำเส้นใยรวมกับวัสดุที่เจริญไปทำการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ ด้วยวิธีของ Suwanno et al. (2005)

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครง โดยการนำสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครง มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของคน จำนวน 2 ชนิด ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ได้แก่

1) เซลล์มะเร็งช่องปาก (Human epidermoid carcinoma; KB)

2) เซลล์มะเร็งปอด (Human lunk carcinoma; A549)

โดยใช้วิธี MTT colorimetric assay (Siripong et al., 2012) ดังนี้คือ

4.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ จำนวน 3x104 เซลล์/หลุม/90 ไมโครลิตร ในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์จำเพาะต่อชนิดของการเจริญของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด (เซลล์ A549 เลี้ยงด้วย DMEM และเซลล์ KB เลี้ยงด้วย MEM) ที่มี 10% fetal bovine serum และ 1% streptomycin-penicilin

4.5.2 นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.5.3 ใส่สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ(0-100mg/ml)และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่าง (untreated control) และ ยารักษามะเร็ง Doxrubicin เป็น positive control

4.5.4 นำไปเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ CO2 incubator เป็นเวลาอีก 72 ชั่วโมง

4.5.5 เมื่อครบกำหนดเวลา เติมสารละลาย MTT (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใน PBS ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.5.6 ดูดส่วนน้ำออก เติม DMSO (dimethylsulfoxide, Merk) ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลาย ผลึกฟอร์มาซาน (formazan)

4.5.7 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate Reader (TECAN, USA)

4.5.8 คำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยกลุ่มควบคุม (control) ที่ไม่ได้รับสารสกัดและมีตัวทำละลาย DMSO อย่างเดียว คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 100% ด้วยสมการดังนี้คือ

$$\% \text{ cell viability} = [\text{OD กลุ่มทดสอบ/OD กลุ่มควบคุม}] \times 100$$

4.5.9 นำค่าที่ได้มาหาค่า IC50 (50% inhibition concentration) สำหรับเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด

หลักเกณฑ์มาตรฐานของการตัดสิน (cut off point) การออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร (active compound) (Kuete & Efferth, 2015)

สารสกัดหยาบจากสมุนไพร (Plant Extracts)

1) In cancer cell lines:

Significant or strong cytotoxicity:	IC50 <20 µg/mL
Moderate cytotoxicity:	20 µg/mL <IC50 <50 µg/mL
Low cytotoxicity:	50 µg/mL <IC50< 200 µg/mL
No cytotoxicity:	IC50 > 200 µg/mL

2) In cancer cell lines (for edible parts of plants, culinary plants and spices)

Significant or strong cytotoxicity:	IC50 <50 µg/mL
Moderate cytotoxicity:	50 µg/mL <IC50 <200 µg/mL
Low cytotoxicity:	200 µg/mL <IC50< 1,000 µg/mL
No cytotoxicity:	IC50 > 1,000 µg/mL

3) In normal cell lines

Significant or strong cytotoxicity:	IC50 <100 µg/mL
Moderate cytotoxicity:	100 µg/mL <IC50 <300 µg/mL
Low cytotoxicity:	300 µg/mL <IC50< 1,000 µg/mL
No cytotoxicity:	IC50 > 1,000 µg/mL

5. แผนการดำเนินงาน

ตารางแผนการดำเนินงาน

กิจกรรม และ ผลงานที่คาดว่าจะสำเร็จ	**งวดที่ 1** (เดือนที่ 1-4)	**งวดที่ 2** (เดือนที่ 5-6)	**งวดที่ 3** (เดือนที่ 7-9)
1. รวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงจากแหล่งต่างๆ จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดแครงที่ให้สารพอลิแซคคาไรด์สูง	←		
2. ศึกษาสูตรอาหารแข็งจากวัสดุ /วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครง ให้สามารถสารพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุด		←	→
3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง2 ชนิด ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (A549) ด้วยวิธี MTT colorimetric assay		←	→
4. จัดทำเล่มวิจัยฉบับสมบูรณ์			← →

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครง

ผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงที่พบในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 13 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างเส้นใยเห็ดแครงจาก กรมวิชาการเกษตร จำนวน 9 สายพันธุ์ โดยมีรหัสสายพันธุ์ดังนี้ SC 005, SC 018, SC 022, SC 023, SC 029, SC 031, SC 034, SC 040, SC 043 (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 เส้นใยเห็ดแครงบริสุทธิ์ ที่ได้รับจากศูนย์บริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 9 สายพันธุ์

นอกจากนั้นได้รวบรวมดอกเห็ดที่ขึ้นในสภาพธรรมชาติ จำนวน 4 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 3 เห็ดแครงที่ขึ้นตามธรรมชาติที่เก็บรวบรวมมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในโครงการนี้

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ในจำนวนนี้ รวบรวมจากที่ขึ้นบนไม้ยางพารา พบที่ อำเภอธารโต อำเภอเมืองยะลา และ ที่นราธิวาส รวม 3 สายพันธุ์ และรวบรวมได้จากที่ขึ้นบนไม้มะม่วง ที่จัง หวัดนนทบุรี จำนวน 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 4

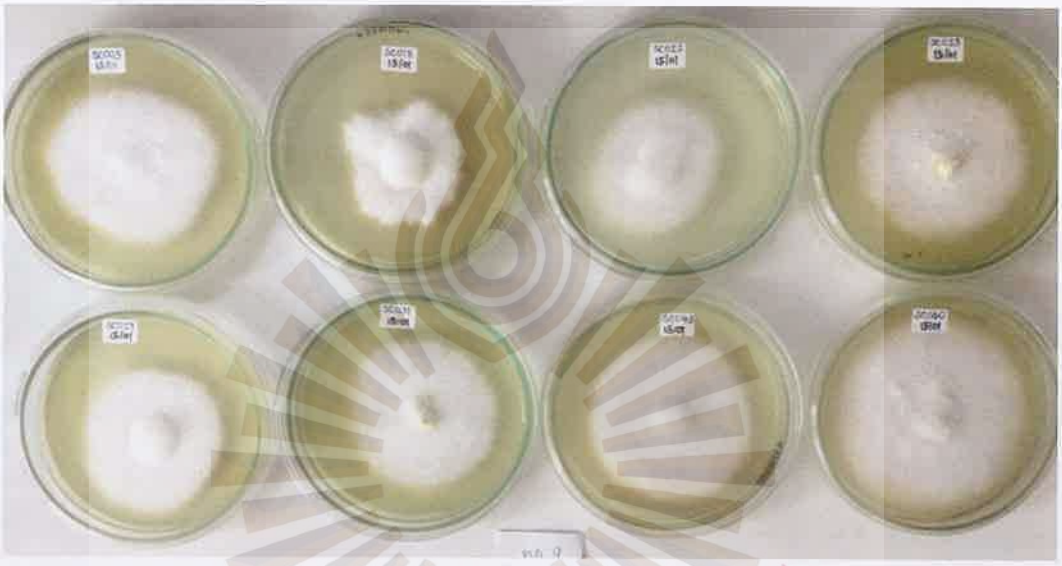
รูปที่ 4 ลักษณะดอกเห็ดแครงที่เก็บจากแหล่งต่างๆ เพื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์

เมื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้แล้ว นำเส้นใยไปเพาะเปิดดอกโดยอาศัยผู้ประกอบการที่มีความชำนาญในการผลิตดอกเห็ดแครงเชิงการค้า พบว่าเส้นใยที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ให้ดอกเห็ดแครง แต่ดอกที่ได้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ มีทั้งดอกเล็กและใหญ่ปะปนกัน ดังแสดงในรูปที่ 5 จึงควรจะต้องมีการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป อย่างไรก็ตามสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดแครงจริง

รูปที่ 5 ลักษณะดอกเห็ดแครง ที่เพาะเลี้ยงจากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก จาก นราธิวาส นนทบุรี ธารโต และยะลา

2. ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยบริสุทธิ์

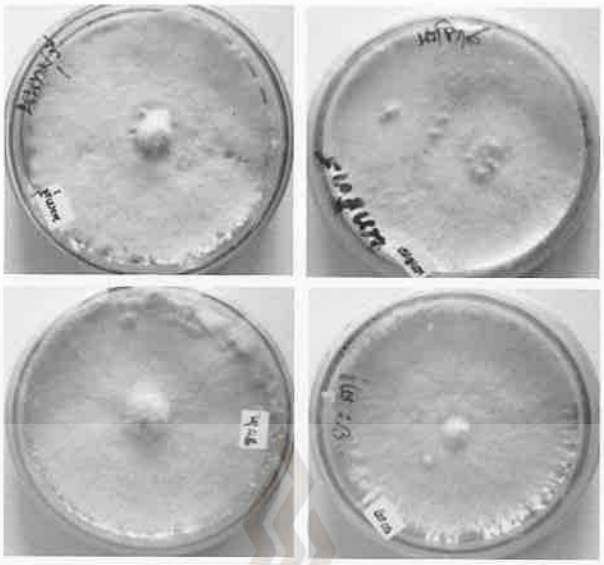
การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเส้นใยบริสุทธิ์ ใยบริสุทธิ์ของเห็ดแครง จำนวน 12 สายพันธุ์ บนอาหาร PDA ที่อายุ 6 วัน พบว่า สายพันธุ์ SC 040 เจริญเติบโตได้เร็วที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยความกว้างของโคโลนี 78 มิลลิเมตร รองลงมาคือ SC 005, SC 023, SC 043, SC 029, และ SC 031 มีค่าเฉลี่ยความกว้างของโคโลนี 71,70 ,74 ,68 และ 69 มิลลิเมตรตามลำดับ สายพันธุ์ SC 018, SC 022 มีการเจริญเติบโตช้าสุด (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 เส้นใยเห็ดแครงไอโซเลทต่างๆ ที่รวบรวมจากศูนย์บริการเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 6 วัน

ตัวอย่างทั้งหมดเจริญเติบโต เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ อายุ 10 วัน เช่นเดียวกับเชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์ รวบรวมจาก นนทบุรี นราธิวาส ธารโตและยะลา เลี้ยงบนอาหาร PDA เจริญเติบโต เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ อายุ 10 วัน (รูปที่ 7)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 7 เชื้อเห็ดแครงบริสุทธิ์รวบรวมจาก นนทบุรี นราธิวาส ตาโต และยะลา เจริญบนอาหาร PDA อายุ 10 วัน

3. ผล การจำแนกเชื้อเห็ดแครงในระดับสปีชีส์ (Species) โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของเห็ดแครงทั้งสิ้น 12 สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ โพรีเมอร์เรส (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบว่า คู่ของไพรเมอร์ ITS1 –ITS4 ,NS1-NS4 และ NL1-NL4 ให้ผลผลิตของ PCR ที่มีขนาด 600,1200 และ 700 คู่เบสตามลำดับ สำหรับไพเมอร์ EF1-983F - EF1-2218R และ RPB2-5F)-RPB2-7R ส่วนใหญ่การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณนี้ ค่อนข้างยาก ต้องทำซ้ำหลายครั้ง ผลการนำ ผลผลิตของ PCR ที่ได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ทิศทาง เพื่อให้ได้ข้อมูลครบถ้วนและเป็นการยืนยันผล และผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบเคียงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยการใช้โปรแกรม Blast n (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดแครง ทั้ง 12 สายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง ITS1-ITS4 สามารถระบุชนิด หรือ สปีชีส์ ได้เป็น *Schizophyllum commune* ทั้งหมดที่ความเหมือน 99.53-100% แสดงดังตารางที่1

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ ITS1- ITS4)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
SC005	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1170	1170	99%	0	100.00	MH857808.1
SC022	*Schizophyllum* sp. BAB-5051 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	99%	0	100.00	KR155096.1
SC023	*Schizophyllum commune* isolate NSC small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	99%	0	99.68	MH221094.1
SC029	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1170	1170	99%	0	100.00	MH857808.1
SC031	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1151	1151	100%	0	99.53	MH857808.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ ITS1- ITS4) (ต่อ)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
SC040	*Schizophyllum commune* isolate ENN1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	99%	0	99.84	MH539647.1
Non	*Schizophyllum commune* isolate ENN1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	99%	0	99.68	MH539647.1
CH	*Schizophyllum commune* isolate Iso4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0	100.00	MN821480.1
DT	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	0	99.68	MH857808.1
YL	*Schizophyllum commune* isolate ENN1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	99%	0	100.00	MH539647.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ ITS1- ITS4) (ต่อ)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
NT	*Schizophyllum commune* genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 45818	1149	1149	100%	0	100.00	AB369910.1

เช่นเดียวกับที่ตำแหน่ง NS1-NS4 ซึ่งสามารถระบุชนิดหรือสปีชีส์ได้เป็น *Schizophyllum commune* ทั้งหมดที่ความเหมือน 100% แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ NS1-NS4)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
SC005	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1146	1146	99%	0	99.84	MH877686.1
SC018	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1151	1151	99%	0	100.00	MH877686.1
SC022	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1142	1142	100%	0	99.84	MH877686.1
SC023	*Schizophyllum commune* strain CBS 124811 large subunit ribosomal RNA gene	1147	1147	100%	0	99.84	MH874930.
SC029	*Schizophyllum commune* strain CBS 405.96 large subunit ribosomal RNA gene	1153	1153	100%	0	100.00	MH874209.1
SC031	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 large subunit ribosomal RNA gene	1147	1147	99%	0	99.84	MH869341.1
SC034	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain UTHSCDI14-5	1153	1153	100%	0	100.00	LT217568.1
SC040	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain MUCL31016	1149	1149	100%	0	100.00	LT217567.1
Non	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain MUCL29305	1151	1151	100%	0	100.00	LT217565.1
CH	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 large subunit ribosomal RNA gene	1146	1146	100%	0	99.84	MH869341.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 2 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ NS1-NS4) (ต่อ)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
DT	*Schizophyllum commune* strain CBS 579.83 large subunit ribosomal RNA gene	1140	1140	99%	0	99.84	MH873368.1
YL	*Schizophyllum commune* gene for large subunit rRNA, partial sequence, strain: IFM 46097	1144	1144	99%	0	100.00	AB363767.1
NT	*Schizophyllum commune* gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: SCC-0749	1142	1142	100%	0	99.68	AB733322.1

และ ที่ตำแหน่ง NL1-NL4 สามารถระบุชนิดหรือสปีชีส์ ได้เป็น *Schizophyllum commune* ทั้งหมดที่ความเหมือน 99.84-100% (ตารางที่3) ทั้งนี้จะเห็นได้ว่า ทุกตัวอย่าง มีค่า % identity สูงมาก ประกอบกับลักษณะของดอกเห็ดดังนั้นการระบุ หรือจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์นี้จึงมีความถูกต้อง

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ D1/D2)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
SC005	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1146	1146	99%	0	99.84	MH877686.1
SC018	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1151	1151	99%	0	100.00	MH877686.1
SC022	*Schizophyllum commune* strain CBS 199.27 large subunit ribosomal RNA gene	1142	1142	100%	0	99.84	MH877686.1
SC023	*Schizophyllum commune* strain CBS 124811 large subunit ribosomal RNA gene	1147	1147	100%	0	99.84	MH874930.
SC029	*Schizophyllum commune* strain CBS 405.96 large subunit ribosomal RNA gene	1153	1153	100%	0	100.00	MH874209.1
SC031	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 large subunit ribosomal RNA gene	1147	1147	99%	0	99.84	MH869341.1
SC034	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain UTHSCDI14-5	1153	1153	100%	0	100.00	LT217568.1

ตารางที่ 3 ผลการจำแนกเห็ดแครงที่รวบรวมได้เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ โดยใช้ ribosomal DNA (บริเวณ D1/D2) (ต่อ)

Isolate no.	Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident (%)	Accession
SC040	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain MUCL31016	1149	1149	100%	0	100.00	LT217567.1
Non	*Schizophyllum commune* partial 28S rRNA gene, strain MUCL29305	1151	1151	100%	0	100.00	LT217565.1
CH	*Schizophyllum commune* strain CBS 342.58 large subunit ribosomal RNA gene	1146	1146	100%	0	99.84	MH869341.1
DT	*Schizophyllum commune* strain CBS 579.83 large subunit ribosomal RNA gene	1140	1140	99%	0	99.84	MH873368.1
YL	*Schizophyllum commune* gene for large subunit rRNA, partial sequence, strain: IFM 46097	1144	1144	99%	0	100.00	AB363767.1
NT	*Schizophyllum commune* gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: SCC-0749	1142	1142	100%	0	99.68	AB733322.1

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงที่รวบรวมได้

การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดแครงที่ให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์สูงสุด สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไปนั้น โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงที่รวบรวมได้ จำนวน 12 ไอโซเลต นาน 10 วัน บนอาหาร PDA ที่มีแผ่นเซลโลเฟล วางไว้บนผิวอาหาร เส้นใยเห็ดแครงจะเจริญบนแผ่นเซลโลเฟล ทำให้สามารถแยกหรือยกเส้นใยออกจากอาหารที่เลี้ยงได้โดยง่าย เพื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ที่เส้นใยสร้างขึ้น พบว่าเส้นใยเห็ดแครงสายพันธุ์ ธารโต SC022 และนราธิวาส ให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ สูงสุด คือ 1.899, 1.452 และ 0.829 % ของเส้นใยเห็ดสด ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ SC040, SC029, SC043, SC005, และ SC031 ให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ 0.540, 0.505, 0.467, 0.457, และ 0.400 % ของเส้นใยเห็ดสดตามลำดับ ที่เหลือให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์น้อยมาก ดังแสดงในตารางที่ 4 จากนั้นได้คัดเลือกเห็ดแครงไอโซเลต ธารโต สำหรับใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ จากเส้นใยเห็ดแครง 12 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 10 วัน

No.	Isolates	Wet weight of mycelium (g)	DI water (ml)	Polysaccharides (g)	Percent of productivity
1	SC005	22.34	223	0.102	0.457
2	SC018	30.29	303	0.055	0.182
3	SC022	24.12	241	0.200	0.829
4	SC023	13.15	132	0.032	0.243
5	SC029	11.00	110	0.056	0.509
6	SC031	14.24	142	0.057	0.400
7	SC040	30.94	309	0.167	0.540
8	SC043	16.28	163	0.076	0.467
9	ธารโต(DT)	21.43	214	0.407	1.899
10	นราธิวาส (NT)	29.54	295	0.429	1.452
11	ยะลา(YL)	23.79	238	0.045	0.189
12	นนทบุรี(Non)	9.71	97	0.024	0.247

5. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงเพื่อให้ได้สารพอลิแซคคาไรด์สูง จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงบนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสูตรหรือกรรมวิธีต่างๆ พบว่า เกือบทุกกรรมวิธีเส้นใยเห็ดแครงเจริญเติมโตได้ดียกเว้นสูตรอาหารที่ใช้ซังข้าวโพด:ลำข้าว:กากถั่วเหลือง อัตตรา 2:6:2 เส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตช้า ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากหลังการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ววัสดุลำข้าวและกากถั่วเหลืองจับกันแน่น ทำให้มีอากาศแทรกอยู่น้อยเส้นใยของเห็ดแครงจึงเจริญเติบโตเฉพาะด้านบน เจริญแทรกลงด้านล่างช้ามาก เมื่อครบ 20 วัน เส้นใย เห็นแครงในอาหารสูตรนี้เจริญไม่ถึงก้นขวดในขณะที่กรรมวิธีอื่นๆ เส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตเติบวัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยง จึงทำให้ต้องตัดกรรมวิธีที่มีสูตรอาหารซังข้าวโพด:รำข้าว:กากถั่วเหลือง ออกเหลือเพียง 5 กรรมวิธี ผลการสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารพอลิแซคคาไลด์ในสูตร อาหารแต่ละกรรมวิธี พบว่าสูตรอาหารที่ใช้กากมะพร้าว : ลำข้าว อัตราส่วน 3:7 ให้ปริมาณสารพอลิแซคคาไลด์สูงสุด รองลงมาได้แก่ สูตรอาหารที่ใช้ซังข้าวโพด:ลำข้าว:ข้าวกล่องสังข์หยดอัตรา 2:6:2 โดยให้ผลิตผลของพอลิแซคคาไลด์ 1.008a และ 0.811% ของน้ำหนักเส้นใยสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับสูตรอาหารอื่นได้แก่ ข้าวฟ่าง : รำข้าว อัตรา 2:8, ซังข้าวโพด :รำข้าว อัตรา 2:8,และกากมัน

สำปะหลัง : รำข้าว อัตรา 4:6 ให้ผลผลิตของพอลิแซคคาไลด์ค่อนข้าวต่ำคือ0.264, 0.250 และ0.235 % ของน้ำหนักเส้นใยสด ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 8

ตารางที่ 5 ผลผลิตของสารพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อเห็ดแครงที่เลี้ยงบนสูตรอาหารแข็งที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

No.	substrates ratio	mycelium+ substrate (g)	DI water (ml)	polysaccharides (g)	percent of productivity
1	sorghum: rice bran=2:8	30	300	0.079	0.264 [c]
2	corncob: rice bran=2:8	30	300	0.075	0.250 [c]
3	corn cob: rice bran: brown rice=2:6:2	30	300	0.244	0.811 [b]
4	cassava pulp: rice bran=4:6	30	300	0.071	0.235 [c]
5	coconut residue: rice bran=3:7	30	300	0.302	1.008 [a]
		CV = 7.1			

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น95% โดยวิธี DMRT

รูปที่ 8 สูตรอาหาร 5 สูตรจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรก่อนใส่เชื้อเห็ดแครง(ซ้าย) และเชื้อเห็ดแครงเจริญ 20 วัน (ขวา)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

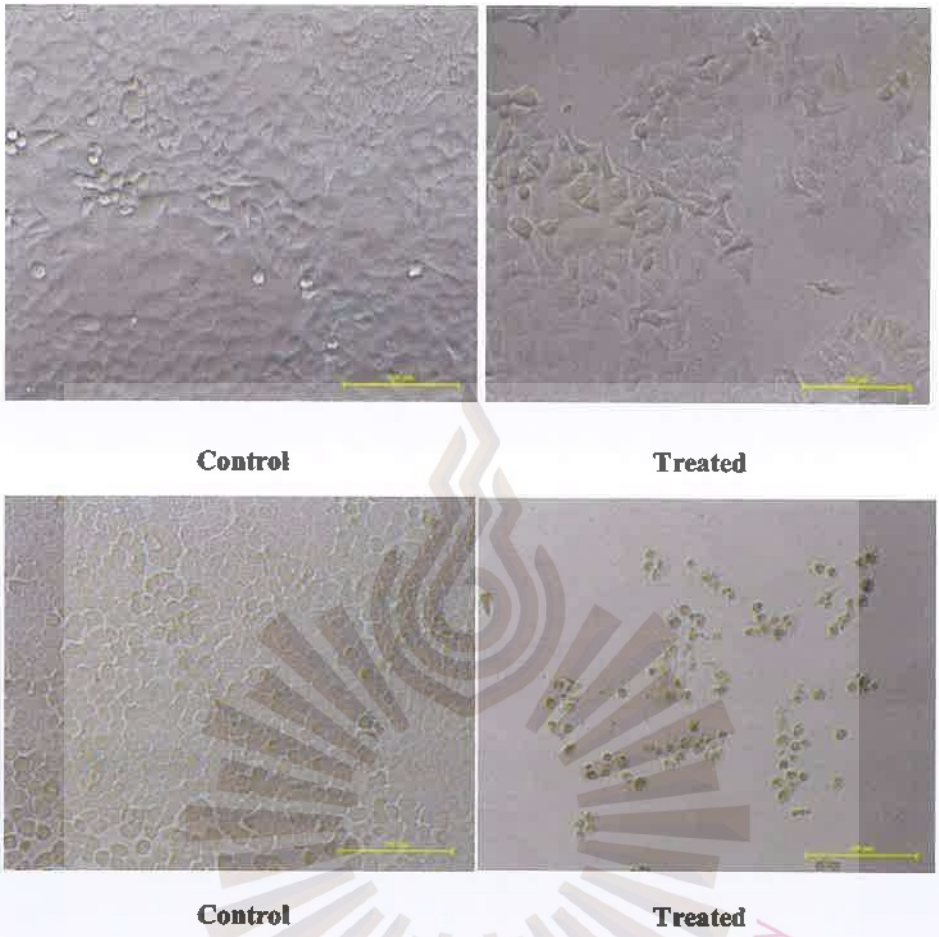
6. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเส้นใยเห็ดแครงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ทดสอบกับเซลล์นาน 72 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (Human epidermoid carcinoma, KB) และเซลล์มะเร็งปอด (Human lung carcinoma, A549) โดยมีค่า IC_{50} = 625.108±73.89 และ > 1000 µg/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 8 ในขณะที่ IC_{50} (Inhibition concentration) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง (50%) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และเมื่อนำผลของค่า IC_{50} ที่ได้ไปเทียบกับหลักเกณฑ์มาตรฐานของการตัดสินการออกฤทธิต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบสมุนไพร (Kuete & Efferth , 2515) พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงมีพิษยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ในระดับต่ำ (low cytotoxicity) และไม่มีฤทธิ์ต้านหรือยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (A549) แต่เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีหลากหลายประเภท Zhang et al. (2013) รายงานว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็คคาไรด์จากเห็ดแครงกลับมีพิษ สามารถออกฤทธิยับยั้งเซลล์เนื้องอก Sarcoma 180 ได้ดีมากที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 50 mg/kg จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงจะให้ผลจำเพาะที่แตกต่างกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (A549) ได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

NO.	ชื่อสาร	IC50 (µg/ml)±SD ; 72 h	
		KB	A549
1	สารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์	625.11±73.89	> 1000
2	Doxorubicin (Positive control)	0.021±0.09	0.38±0.12

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University



รูปที่ 9 ฤทธิ์ต้านเซลมะเร็งช่องปาก (KB) และมะเร็งปอด (A549) ของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและอภิปรายผล

1. สรุปผลการทดลอง

โครงการนี้ ได้ทำการรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง โดยได้รับจากกรมวิชาการเกษตร 8 ตัวอย่าง และ ได้แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ดแครงสดที่ขึ้นตามธรรมชาติ 4 ตัวอย่าง เส้นใยบริสุทธิ์ทุกตัวอย่างได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นเส้นใยของเห็ดแครงจริง โดยการนำเส้นใยไปทำการเพาะเลี้ยงให้สร้างดอกเห็ดและทำการจำแนกเส้นใย โดยวิธีชีวโมเลกุลที่ตำแหน่ง ITS1-ITS4, NS1-NS4 และ NL1-NL4 พบว่าเป็นเชื้อ *Schizophyllum commune* ทุกตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 10 วัน พบว่าตัวอย่างที่เก็บจากธารโต ให้ปริมาณสารพอลิแซคคอไรด์สูงสุด รองลงมาคือ นราธิวาส และ SC022 ให้ปริมาณสารพอลิแซคคอไรด์ เท่ากับ 1.899, 1.452 และ 0.829 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเส้นใยสดตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ พบว่าสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของกากมะพร้าวกับรำข้าวอัตรา 3:7 ให้ผลผลิตของสารพอลิแซคคาไรด์สูงสุดรองลงมาคือสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของซังข้าวโพดกับรำข้าวและข้าวกล้องในอัตรา 2:6:2 โดยให้ผลผลิตของสารพอลิแซคคอไรด์ 1.008 และ 0.811 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักเส้นใยสดตามลำดับ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครงที่ความเข้มข้นต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดแครงออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก (Human epidermoid carcinoma; KB) ในระดับต่ำโดยมีค่า IC 50 เท่ากับ 625.108± 73.89 µg/ml และไม่มีพิษในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Human lung carcinoma; A549) โดยมีค่า IC 50 สูงกว่า 1000 µg/ml

2. อภิปรายผลการทดลอง

การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดแครงในโครงการนี้ได้รับการอนุเคราะห์เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดแครงจำนวน 8 สายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรและ 4 สายพันธุ์ผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมดอกเห็ดสดที่ขึ้นบนขอนไม้จากธรรมชาติมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ดังนั้นก่อนที่จะนำไปศึกษาขั้นต่อไปจึงต้องทำการพิสูจน์ทราบว่าเส้นใยบริสุทธิ์เหล่านั้นเป็นเส้นใยของเห็ดแครงจริงในเบื้องต้นโดยใช้วิธีการนำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกเห็ด จากนั้นนำเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดแครงไปศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อในด้านความสามารถของ

การใช้สารอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตเร็วและให้เส้นใยหนาแน่น ในระยะแรกผู้วิจัยได้เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงในอาหาร SPBD ที่ประกอบด้วยมันเทศหนัก 250 g เปปโตนหนัก 1 g วิตามินบี 6 จำนวน 0.5 g แคลเซียมคลอไรด์หนัก 1.3 g เดกซ์โตรสหนัก 20 g และวุ้นหนัก 15g ในน้ำ 1 ลิตร โดยที่อาหาร SPBD สามารถเพิ่มผลผลิตของเส้นใยเห็ดแครงได้ดีทั้งยังให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและเส้นใยที่หนาแน่นกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA แต่เนื่องจากมันเทศที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารมีสายพันธุ์ที่ค่อนข้างหลากหลายแตกต่างกันมากทั้งขนาดของหัว รูปร่าง และสีของเนื้อมัน จึงทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถหาวัตถุดิบที่เหมือนเดิมได้ทุกครั้ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเปลี่ยนไปใช้อาหาร PDA สำเร็จรูปแทน

สำหรับการจำแนกเส้นใยเห็ดแครงในระดับสปีชีส์โดยวิธีทางชีวโมเลกุลหรือการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดแครงในการทดลองนี้ได้ใช้ลำดับพันธุกรรมบน rDNA ของ 3 บริเวณ คือ Internal Transcribe Spacer (ITS1-ITS4) ที่เป็นบริเวณที่มีความผันแปรสูงเหมาะแก่การจำแนกเชื้อราเมากที่สุดโดยเฉพาะเชื้อรากลุ่มเห็ด (Basidiomycota) ส่วนบริเวณ Small-subunit (SSU) เป็นส่วนที่มีความผันแปรปานกลาง (NS1-NS4) และส่วนของ Large-subunit (26S) ได้แก่ (LR1-LR3) ซึ่งทั้ง 3 บริเวณนี้ให้ผลยืนยันตรงกันว่าเป็นลำดับพันธุกรรมของ *S.commune* เหตุที่ต้องใช้ rDNA ทั้ง 3 บริเวณในการระบุชื่อวิทยาศาสตร์เพราะถึงแม้ว่าวิธีการจำแนกนี้ส่วนใหญ่จะแม่นยำและเป็นที่นิยม แต่พบว่ามีเชื้อราจำนวนเพียง 30% ที่ได้รับการจำแนกแล้วโดยวิธีนี้เท่านั้น ซึ่งหมายถึงว่าลำดับพันธุกรรมที่มีอยู่ในฐานข้อมูลสาธารณะ (GenBank) ในปัจจุบันนี้อาจมีไม่มากพอ ดังนั้นบางข้อมูลในจำนวนนี้อาจมีการจำแนกผิดอยู่บ้าง

และพบว่าเส้นใยเห็ดแครงสามารถเจริญเติบโตบนอาหารทั้ง 5 สูตรได้ดีโดยเฉพาะสูตรอาหารที่ 1 ที่มีข้าวฟ่างผสมรำข้าวอัตราส่วน 2 : 8 สูตรที่ 2 ที่มีซังข้าวโพดผสมกับรำข้าวอัตราส่วน 2 : 8 และสูตรที่ 4 ที่มีกากมันสำปะหลังผสมกับรำข้าวเส้นใยเจริญเติบโตคลุมวัสดุปลูกภายในเวลา 14 วันหลังใส่เส้นใยเห็ดแครง เมื่อครบ 20 วัน บางขวดเส้นใยมีการรวมตัวกันคล้ายจะสร้างดอกเห็ดแต่สำหรับสูตรอาหารที่ 3 ประกอบด้วยซังข้าวโพดผสมกับรำข้าวและข้าวกล้องอัตราส่วน 2:6:2 และสูตรอาหารที่ 5 ประกอบด้วยกากมะพร้าวผสมกับรำข้าวอัตราส่วน 3:7 เส้นใยเจริญเติบโตคลุมวัสดุปลูกในเวลา 20 วันหลังปลูกเชื้อเห็ดแครงและการที่สูตรอาหาร (1, 2 และ 4) เส้นใยเห็ดแครงเจริญเติบโตเร็ว คลุมวัสดุภายใน 14 วันแต่ปล่อยไว้จนครบ 20 วันจึงทำการสกัดสารพอลีแซคคาไรด์อาจเป็นสาเหตุให้ได้ผลผลิตสารพอลิแซคคาไรด์ต่ำเพราะเมื่อเชื้อเห็ดแครงใช้อาหารบนวัสดุปลูกที่เป็นแหล่งคาร์บอนหมดไป เส้นใยเห็ดแครงยังสามารถใช้สาร Schizophyllan ซึ่งเป็นผลผลิตที่ตัวเองสร้างขึ้นมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่หมดไปได้ ทั้งนี้เพราะเส้นใยเห็ดแครงสามารถสร้างเอนไซม์ β-glucanases เพื่อย่อย β-glucan หรือ Schizophyllan ได้ (Reyes et al., 2009)

วิธีการการสกัดสารพอลีแซคคาไรด์จากเห็ดแครงที่เป็นนิยม คือ การตกตะกอนจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงหรือสกัดจากดอกเห็ดแครงแห้ง แต่ในการทดลองนี้ การสกัดจากเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารแข็งนั้นมีข้อได้เปรียบกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว คือไม่ต้องเขย่าหรือกวนเพื่อเพิ่มออกซิเจนหรือขั้นตอนการผลิตดอกเห็ดแครงต้องใช้เวลานานกว่าเพราะการเปิดดอกอาจมีโรคแมลงรบกวน บางครั้งต้องใช้สารป้องกันกำจัดนอกจากนั้นแล้วการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารแข็งยังอาจนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าและลดต้นทุนการผลิตด้วย แต่มีข้อด้อยคือขาดข้อมูลเรื่องวิธีการสกัดสารโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดแครง ซึ่งในการทดลองนี้ทำตามขั้นตอนของ Suwanno et al. (2005) โดยใช้เส้นใยเห็ดแครง 1 กรัมต่อน้ำ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 20 นาที แต่ปัญหาในการสกัดสารของการทดลองนี้อยู่ที่เส้นใยเห็ดแครงที่ทำการเพาะเลี้ยง 20วัน บนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีการจับตัวกันแน่นของกลุ่มเส้นใยเพิ่มเริ่มสร้างดอกเห็ด ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการสกัดสารเพราะกลุ่มเส้นใยที่จับตัวกันแน่นจะนิ่มลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหลังจากออกจากหม้อนึ่งความดัน ทำให้ได้สารพอลีแซคคาไรด์ในปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสูตรอาหารและระยะเวลาการเลี้ยงเส้นใยที่มีอายุพอเหมาะแก่การสกัดสารพอลีแซคคาไรด์เพิ่มเติม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhong et al. (2013) ที่เลี้ยงเส้นใยเห็ดแครงบนอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าวสาลี (wheat bran) ผสมกับซังข้าวโพด (corn cobs) อัตราส่วน 8:2 (w/w) ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 7-8 วัน สกัดโดยต้มในน้ำอุณหภูมิ 85°C นาน 10 นาทีให้สารพอลิแซคคาไรด์ค่อนข้างสูงคือ 9.5±0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ในระดับต่ำ IC50 = 615.108±73.89 µg/ml) และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดแครงมีโครงสร้างและขนาดโมเลกุลต่างๆกันเฉพาะที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 10,000-200,000 Da เท่านั้นจึงมีผลต่อต้านเซลล์มะเร็งแต่กลับพบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งนี้จากการศึกษาระยะหลังพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีดังนี้ (Wasser, 2002)

1) การกินเห็ดและสารที่เตรียมจากเห็ดสามารถช่วยป้องกันการเกิดเนื้องอกได้

2) มีปฏิกิริยาต่อต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆได้โดยตรง

3) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะรวมถึงผลของ Chremotherapy

4) ป้องกันผลการแพร่กระจายของเนื้อร้าย

3. ข้อเสนอแนะ

3.1 ควรมีการศึกษาวิธีการผลิตสาร Schizophyllan จากส้นใยเห็ดแครงโดยใช้ Solid state cultivation ด้วยวัสดุที่เหลือใช้ทางการเกษตรเพิ่มเติม โดยเฉพาะปัจจัยต่างๆที่สามารถเพิ่มผลผลิตของสาร Schizophyllan ตลอดจนอายุของเส้นใยที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดสารเพื่อหาวิธีต้นแบบสำหรับพัฒนาการผลิตสาร Schizophyllan เชิงอุตสาหกรรมต่อไป

3.2 จากการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบพอลิแซคคอไรด์จากเส้นใยเห็ดแครงให้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแตกต่างกันและพบว่านอกจากยับนั้งเซลล์มะเร็งแล้วสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ของเห็ดหลิงจือที่ความเข็มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหรือ T-cell (Chung, 2001) ดังนั้นจึงควรนำสารสกัดของเส้นใยเห็ดแครงนี้ไปทำการศึกษาเรื่องการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ต่อด้วย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เอกสารอ้างอิง

Adejoye, O. D., Adebayo-Tayo, B. C., Ogunjobi, A. A. & Afolabi, O. O. (2007). Physicochemicalstudies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian edible fungus. World Applied Sciences Journal. 2 (1), 73-76.

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A. B, Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S, T., Lai, O. S., Sung, B. & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm. Res. 25 (9), 2097–2116.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S. J., Fordham-Skelton, A. P., Rizkallah, P. J, Wilkinson, M. C. & Reynolds, C. D. (2006). Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *schizophyllum commune*. BBRC1760, 326–332.

Chung, W. T., Lee, S. H., Kim, J. D., Park, Y. S., Hwang, B., Lee, S. Y., & Lee, H. Y. (2001). Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 92 (6), 550-555.

Daba, A. S., & Ezeronye, O. U. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. African Journal of Biotechnology, 2(12), 672-678.

Dasanayaka, P. N., & Wijeyaratne, S. C. (2017). Cultivation of Schizophyllum commune mushroom on different wood substrates. Journal of Tropical Forestry and Environment 7(1), 65-73.

Du, B., Yang, Y., Bian, Z., & Xu, B. (2017). Characterization and anti-inflammatory potential of an exopolysaccharide from submerged mycelial culture of *Schizophyllum commune*. Frontiers in pharmacology, 8, 252.

Guarro, J., Gene, J. & Stchigel, A. M. (1999). Development of Fungal Taxonomy. Clinical Microbiology Reviews. 12, 454-500.

Han, C. H., Liu, Q. H., Ng, T. B., & Wang, H. X. (2005). A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. Biochemical and biophysical research communications, 336(1), 252-257.

Hobbs, C. (1995). Medicinal mushrooms an exploration of tradition, healing and culture, Interweave Press, Inc., Love land, 251 p.

Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2013). Identification and species-typing of wood rotting fungi using melting curve analysis. Journal of wood science, 59(5), 432-441.

Hui-Min, Y.A.O., Gan, W.A.N.G., Ya-Ping, L.I.U., Ming-Qiang, R.O.N.G., Chuan-Bin, S.H.E.N., Xiu-Wen, Y.A.N., Xiao-Dong, L.U.O. & Ren, L.A.I. (2016). Phenolic acids isolated from the fungus *Schizophyllum commune* exert analgesic activity by inhibiting voltage-gated sodium channels. Chinese journal of natural medicines, 14(9), 661-670.

Jamshidian, H., Shojaosadati, S. A., Vilaplana, F., Mousavi, S. M., & Soudi, M. R. (2016). Characterization and optimization of schizophyllan production from date syrup. International journal of biological macromolecules, 92, 484-493.

Joshi, M., Patel, H., Gupte, S., & Gupte, A. (2013). Nutrient improvement for simultaneous production of exopolysaccharide and mycelial biomass by submerged cultivation of *Schizophyllum commune* AGMJ-1 using statistical optimization. 3 Biotech, 3(4), 307-318.

Jung-Ki, K., Koo, J. G., Park, S. W., Cho, M. G., Kang, B. C., Buchholz, R. & Goetz, P. (2005) Optimal criterion for the scale-up Production of schizophyllan in the stirred tank reactor. Journal of microbiology and biotechnology, 15(1), 1-6.

Kitamura, S., Hirano, T., Takeo, K., Fukada, H., Takahashi, K., Falch, B. H., & Stokke, B. T. (1996). Conformational transitions of schizophyllan in aqueous alkaline solution. Biopolymers, 39(3), 407-416.

Krupodorova, T. A., & Barshteyn, V. Y. (2015). Alternative substrates for higher mushrooms mycelia cultivation. Journal of BioScience & Biotechnology, 4(3).

Limin, H., Jianchun, Z., Tianyi, W., Jian, Z., Jike, L., Qizhi, W., Xiaojuan, Z. and Xinhui, X., (2013). Purification and characterization of schizophyllan from *Schizophyllum Commune*. Engineeing Sciences,11(2), 88-92.

Liu, C., Choi, M. W., Li, X., & Cheung, P. C. (2018). Immunomodulatory effect of structurally-characterized mushroom sclerotial polysaccharides isolated from *Polyporus rhinocerus* on human monoctyes THP-1. Journal of Functional Foods, 41, 90-99.

Mayell, M. (2001). Maitake extract and their therapeutic potential-a review. Altern Medicine Review, 6 (1), 48-60.

Mirfat, A. H. S., Noorlidah, A., & Vikineswary, S. (2010). Scavenging activity of *Schizophyllum commune* extracts and its correlation to total phenolic content. Journal of tropical agriculture and food science, 38(2), 231-238.

Mirfat, A. H. S., Noorlidah, A. & Vikineswary, S. (2014). Antimicrobial activities of split gill mushroom *Schizophyllum commune* Fr. American Journal of Research, 2(7), 113-124.

Miyazaki, K., Mizutani, H., Katabuchi, H., Fukuma, K., Fujisaka, S., & Okamura, H. (1995). Activated (HLA-DR+) T-lymphocyte subsets in cervical carcinoma and effects of radiotherapy and immunotherapy with sizofiran on cell-mediated immunity and survival. Gynecologic oncology, 56(3), 412-420.

Muruke, M. H. S., Kivaisi, A. K., Magingo, F. S. S., & Danell, E. (2002). Identification of mushroom mycelia using DNA techniques. Tanzania Journal of Science, 28, 115-128.

Nasreen, Z., Khan, S. J., Yasmeen, A., Shafique, M., Usman, S., & Ali, S. (2015). Optimization of sub-merged culture conditions for biomass production in *Schizophyllum commune*, a medicinal mushroom. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(2), 258-266.

Nie, X.H., Shi, B.J., Ding, Y.T.& Tao, W.Y. (2006). Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. International Journal of Biological Macromolecules, 39, 228–233.

Okazaki, M., Adachi, Y., Ohno, N., & Yadomae, T. (1995). Structure-activity relationship of (1⟶ 3)-β-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 18(10), 1320-1327.

Preecha, C. & Thongliumnak, S. (2015). Bag opening technique for bag spawn culture of spit gill mushroom (*Schizophyllum commune*). Journal of Agricultural Technology, 11(2), 367-372.

Rau, U., Gura, E., Olszewski, E., & Wagner, F. (1992). Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. Journal of Industrial Microbiology, 9(1), 19-25.

Reyes, R.G., Brabl, W. & Rau, U. (2009). Coconut water as a novel culture medium for biotechnology production of Schizophyllan, Journal of NatureStudies, 7(2), 1-6.

Sminou, D., Krcmar, M. & Prochazkova, E. (2011). Chitin-Glucan complex production by *Schizophyllum commune* submerged cultivation. Polish Journal of Microbiology, 60(3), 223–228.

Sutivisedsak, N., Leathers, T. D. & Price, N. P. J. (2013). Production of schizophyllan from distiller's driedgrains with solubles by diverse strains of *Schizophyllum commune*. SpringerPlus, 2(476), 1-6.

Teoh, Y. P., & Mat Don, M. (2014). Mycelia growth and production of total flavonoids and 4H-pyran-4-one, 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-by *Schizophyllum commune* using a bubble column bioreactor considering aeration effect and mass transfer study. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 28(4), 553-559.

Wasser, S. P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied microbiology and biotechnology, 60(3), 258-274.

Zhang, Y., Kong, H., Fang, Y., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2013). Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 1(1), 53-71.

Zhong, K., Liu, L., Tong, L., Zhong, X., Wang, Q., & Zhou, S. (2013). Rheological properties and antitumor activity of schizophyllan produced with solid-state fermentation. International journal of biological macromolecules, 62, 13-17.

Zhong, K., Tong, L., Liu, L., Zhou, X., Liu, X., Zhang, Q., & Zhou, S. (2015). Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment. International journal of biological macromolecules, 80, 302-308.

Zhou, B., Fu, Q., Song, S. S., Zheng, H. L., & Wei, Y. Z. (2015). Inhibitory effect of schizophyllan on rat glioma cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *10*(4), 759-764.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า	☐ นาย ☑ นาง ☐ นางสาว
ตำแหน่งทางวิชาการ	☐ ศ ☐ รศ. ☐ ผศ. ☐ อื่นๆ
ชื่อผู้วิจัย	หทัยรัตน์
นามสกุลผู้วิจัย	อุไรรงค์
ชื่อภาษาอังกฤษ	Hathairat
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Urairong
วัน/เดือน/ปีเกิด	14 กรกฎาคม 2498
ที่อยู่	18/7 หมู่ 14 ต.บางแม่นาง อ.บางใหญ่
จังหวัด (บ้าน)	นนทบุรี
รหัสไปรษณีย์ (บ้าน)	11140
แฟกซ์ (บ้าน)	-
ที่อยู่ (ที่ทำงาน)	วิทยาลัยนวัตกรรมเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร ตึก 5/1 ชั้น 4 มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก ตำบลหลักหก ถนนพหลโยธิน อำเภอเมืองฯ
จังหวัด (ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์ (ที่ทำงาน)	02-997-2200 ต่อ 3427
แฟกซ์ทำงาน	-
E-mail Address:	fongptt@yahoo.com; hathairat.u@rsu.ac.th

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สาขา	อารักขาพืช
ปีที่จบ	2520
สถาบัน	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประเทศ	ไทย

ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	โรคพืช/ปรับปรุงพันธุ์
ปีที่จบ	2532
สถาบัน	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประเทศ	ไทย

ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขา	โรคพืช
ปีที่จบ	2550
สถาบัน	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ประเทศ	ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ

ชูชีวิน กาญจนถาวร เชาวลิต มณฑล และ **หทัยรัตน์ อุไรรงค์** ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าขมิ้นชันที่ปลูกด้วยระบบเกษตรอินทรีย์ในพื้นที่จังหวัดลพบุรี งานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2564 30 เมษายน 2564 http://rsucon.rsu.ac.th/proceeding

Kanchanathawornviboon, X., Monton, C. and **Urairong, H.** (2021). Microwave- assisted extraction of curcuminoids from organic Curcuma longa L. in different oil types for cosmetic purpose: An optimization approach. Journal of Current Science and Technology, 11(1), 71-89.

Khumpumuang, P., **Urairong, H.**, Yongsawatdigul, J. and Rodtong, S. (2019). Selection of soil bacterial for controlling cassava meal bugs. Suranaree Journal of Science Technology. 26 (2):166-186.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

Urairong, H. , Wongsri, O. and Jaroensanit, T.N. (2017). Molecular markers for analysis of genetics diversity and identification of oil palm hybrid varieties. Thai Agricultural Research Journal 35(2):117-135.

Sripholtaen A., Charoenchai, C. and **Urairong, H.** (2016). Application of microsatellite markers for identification of wine grape varieties in Thailand. KKU Research Journal. 21(1):97-110.

Wongsorn, D., Saksirirat, W. Sirimungkararat, S. and **Urairong, H.** (2015). Screening for eri silkworm (Samia ricini Donovan) ecoraces using morphological characters, growth, yields and ISSR marker. Songklanakarin J. Sci. Technol.37(5):499-505.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

-

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ

Rodtong, S., Siripong, P., Yahaufai, J., Piyaviriyakul, S., Unsrisawat, P., Rassamee, K., Nontakham, J. and Urairong, H. 2019. The edible split-gill fungus as an alternative source for mushroom tea.The 2019 Asia-Pacific Tea Expo (APTE 2019), 3-4 March 2019, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan: P-7.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

1. ได้รับพระราชทานรางวัลเกียรติคุณ บุคคล หน่วยงานและโครงการดีเด่นของชาติ ประจำปี 2548 โครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เป็นโครงการดีเด่นของชาติสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่ง คัดเลือก โดยคณะอนุกรรมการคัดเลือกและเผยแพร่ผลงานดีเด่นแห่งชาติใน คณะกรรมการเอกลักษณ์ของชาติ สำนักงานเสริมสร้างเอกลักษณ์ของชาติ สำนักงานปลัดสำนักนายกรัฐมนตรี

2. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2547 ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน เรื่องโครงการลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวไทย

3. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2556 ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน เรื่อง การพัฒนาเอ็นไซม์ แอลฟา อะไมเลส จากเชื้อ *Bacillus sp.*และการแสดงออกในเซลล์ *Escherichia coli* เพื่อการผลิตเอทานอล

4. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2556 ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน เรื่อ การโครนยีนไซโคลฟีลินจากข้าวฟ่างและการแสดงออกของยีนในยาสูบ

5. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน เรื่องเครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

6. ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2560 ประเภทงานวิจัยประยุกต์ เรื่อง เทคนิคการตรวจกล้าปาล์มน้ำมันลูกผสมอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร

-

สาขาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

เทคโนโลยีชีวภาพพืช

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลตรวจสอบพันธุ์พืชและจุลินทร์

ปรับปรุงพันธุ์พืช(ข้าว)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University