การบ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อรา *M. hyalina, M. capitata* และ *M. chlamydospora*

IDENTIFICATION OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE FUNGAL GENUS *Mortierella* AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM FUNGAL EXTRACTS OF *M. hyalina, M. capitata* AND *M. chlamydospora*

ณรรฐนนท์ เนาวประสิทธิ์

ณัฐริกา เกิดทรัพย์

นันทิกานต์ พรหมสุทธิ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IDENTIFICATION OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE FUNGAL GENUS *Mortierella* AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM FUNGAL EXTRACTS OF *M. hyalina, M. capitata* AND *M. chlamydospora*

NUTTANON NAOVAPRASIT
NATTARIKA KOETSAP
NANTIKAN PHROMSUT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR FOR SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การบ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อรา *M. hyalina*, *M. capitata* และ *M. chlamydospora*

Identification of Morphological Characteristics of the Fungal Genus *Mortierella* and the Antioxidant Activity from Fungal Extracts of *M. hyalina*, *M. capitata* and *M. chlamydospore*

ชื่อนักศึกษา	นายณรรฐนนท์	เนาวประสิทธิ์	รหัสนักศึกษา	58050743
	นางสาวณัฐริกา	เกิดทรัพย์	รหัสนักศึกษา	58050755
	นางสาวนันทิกานต์	พรหมสุทธิ์	รหัสนักศึกษา	58050772

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ประธานกรรมการ	
รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การบ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อรา *M. hyalina*, *M. capitata* และ *M. chlamydospora*			
ชื่อนักศึกษา	นายณรรฐนนท์	เนาวประสิทธิ์	รหัสนักศึกษา	58050743
	นางสาวณัฐริกา	เกิดทรัพย์	รหัสนักศึกษา	58050755
	นางสาวนันทิกานต์	พรหมสุทธิ์	รหัสนักศึกษา	58050772
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)			
ภาควิชา	ชีววิทยา			
คณะ	วิทยาศาสตร์			
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง			
ปีการศึกษา	2561			
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม			
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์			

บทคัดย่อ

คัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* จากตัวอย่างดิน NTS-18-001 จากน้ำตกทีลอซู อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก สามารถคัดแยกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมดจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ TLS01-01 และ TLS01-02 เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้จากดินกับเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่ได้รับความอนุเคราะห์ จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *M. hyalina*, *M. capitata* และ *M. chlamydospora* ไปศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา พบว่าเชื้อรา *M. capitata* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดและ *M. chamydospora* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุด ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 9 สารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลในเชื้อรา *M. hyalina*, *M. capitata* และ *M. chlamydospora* ด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดที่มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเกินร้อยละ 50 ได้แก่ สารสกัดชั้นเมทานอลของ *M. capitata* และ *M. hyalina* โดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} (50 Inhibitory concentration) เท่ากับ 2,394 และ 2,522 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในวิธี ABTS มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,885 และ 2,954 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าสามารถนำสารสกัดจากเชื้อราในสกุล *Mortierella* ไปยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระได้ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับสารสกัดอื่นๆเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ : *M. capitata*, *M. chlamydospora*, *M. hyalina*, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Identification of Morphological Characteristics of the Fungal Genus *Mortierella* and the Antioxidant Activity from Fungal Extracts of *M. hyalina*, *M. capitata* and *M. chlamydospora*
Student Name	Mr. Nuttanon Noavaprasit Student ID 58050743 Ms. Nattarika Koetsap Student ID 58050755 Ms. Nantikan Phromsut Student ID 58050772
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Assoc Prof Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Dr. Narumon Tangthirasunun

Abstract

Isolation of fungal *Mortierella* genus from NTS-18-001 soil samples at Thee Lor Su Waterfall Umphang District, Tak Province, can separate fungi with morphology. There are 2 isolates, TLS01-01 and TLS01-02. When bring fungi that isolated from soil and fungal *Mortierella* genus received kindly, 3 samples were *M. hyalina M. capitata* and *M. chlamydospora* to study the growth rate of fungi. The results showed that the fungus *M. capitata* had the best growth rate and *M. chamydospora* had the lowest growth rate in all. The results of antioxidant activity of all 9 extracts of *M. hyalina, M. capitata* and *M. chlamydospora* extracts using DPPH and ABTS methods. At a concentration of 4,000 µg/ml, extracts have a percentage greater than 50 percent include extracts in the methanol layer of *M.capitata* and *M. hyalina*, by DPPH IC_{50} (50 Inhibitory concentration) method equal to 2,394 and 2,522 respectively and in ABTS IC_{50} is equal to 1,885 and 2,954 respectively Which can be said that extracts from *M. hyalina, M. capitata* and *M. chlamydospora* can be used to inhibit the formation of free radicals, which may be used with other extracts to further develop effective products

Keywords : *M. capitata, M. chlamydospora, M. hyalina,* Antioxidant

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของ ... ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถดำเนินการโดยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับการสนับสนุน ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ เป็นอย่างยิ่ง ที่สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องทำให้โครงงานนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ประธานกรรมการที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ขอขอบคุณ นางสาวสุภานัน สุขศิริ ในการอนุเคราะห์เชื้อราสกุล *Mortierella* ที่ใช้สำหรับการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษเสมอมา และขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ปริญญาโททุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้คำแนะนำเสมอมา ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณงามความดีที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณงามความดีของผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ณรรฐนนท์ เนาวประสิทธิ์
ณัฐริกา เกิดทรัพย์
นันทิกานต์ พรหมสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... จ
สารบัญรูป ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เชื้อราสกุล *Mortierella* 3
2.1.1 อนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Mortierella* 4
2.1.2 วงจรชีวิตของเชื้อราสกุล *Mortierella* 4
2.1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราสกุล *Mortierella* 6
2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 8
2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบกับสารละลาย DPPH 8
2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบกับสารละลาย ABTS 9
2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
3.1 ตัวอย่างดิน 11
3.2 ตัวอย่างเชื้อรา 11
3.3 สารเคมี 11
3.4 อุปกรณ์ 12
3.5 วิธีการทดลอง 13
3.5.1 การคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.2 การบ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 13
3.5.3 การสกัดสารจากเชื้อราสกุล *Mortierella* 14
3.5.4 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ 14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* 16
4.1.1 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella* 16
4.1.2 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella* ไอโซเลต TLS01-01 19
4.1.3 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella* ไอโซเลต TLS01-02 20
4.1.4 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* 22
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต 24
4.2.1 การทดสอบด้วยสารละลาย DPPH 24
4.2.2 การทดสอบด้วยสารละลาย ABTS 26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 29
5.1 สรุปผลการวิจัย 29
5.2 ข้อเสนอแนะ 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 33
ภาคผนวก ก 34
ภาคผนวก ค 36
ภาคผนวก ง 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงขนาดอับสปอร์ของเชื้อราสกุล *Mortierella* จำนวน 5 ไอโซเลต..... 21

4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* ทั้ง 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ณ ระยะเวลาต่าง ๆ..... 23

4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*..... 25

4.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในชั้นเมทานอล..... 25

4.5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*..... 27

4.6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั้นเมทานอล..... 27

ค.1 ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella hyalina*..... 36

ค.2 ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella chlamydospora*..... 37

ค.3 ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella capitata*..... 38

ค.4 ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-01..... 39

ค.5 ค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-02..... 40

ค.6 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน..... 41

ค.7 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M.capitata* ในชั้นเมทานอล..... 41

ค.8 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M.hyalina* ในชั้นเมทานอล..... 42

ค.9 ผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์..... 43

ค.10 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน..... 44

ค.11 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M. capitata* ในชั้นเมทานอล..... 44

ค.12 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M. hyalina*..... 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค.13 ผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะการเกิดโคโลนีของเชื้อราสกุล *Mortierella*	3
2.2	แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Mortierella*	5
2.3	แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Mortierella*	6
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M. chlamydospora* (CHP28-S05) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี ด้านหลังโคโลนี เส้นใยของรา อยู่ติดกับเส้นใย ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์	17
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *M. capitata* (CHP06-S03) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี ด้านหลังโคโลนี เส้นใยของรา สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย และอับสปอร์	18
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *M. hyalina* (CHP33-S06) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี ด้านหลังโคโลนี เส้นใยของรา เส้นใยที่น้ำมัน สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์	19
4.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี ด้านหลังโคโลนี เส้นใยของรา สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย อับสปอร์	20
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี ด้านหลังโคโลนี เส้นใยของเชื้อรา สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์	21
4.6	กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์	26
4.7	กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์	28
ค.1	กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata*, *M. Hyalina* และ *M. chlamydospora*	42
ค.2	แสดงค่า IC_{50} จากสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata*, *M. hyalina* ที่ทดสอบกับสารละลาย DPPH	43
ค.3	กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata*, *M. Hyalina* และ *M. chlamydospora*	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ค.4 แสดงค่า IC_{50} จากสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata*, *M. hyalina* ที่ทดสอบกับสารละลาย ABTS..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากพืช สัตว์ และเชื้อรา มาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันเพิ่มมากขึ้น โดยนำไปใช้ทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะด้านการแพทย์ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เป็นต้น แม้ว่าสารสกัดจากเชื้อรานั้นถึงมีการศึกษาเป็นจำนวนมาก แต่การนำสารสกัดจากเชื้อราไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้านการแพทย์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมความงามต่าง ๆ นั้นยังไม่ค่อยแพร่หลาย ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำสารสกัดจากเชื้อรามาศึกษา และนำไปใช้ในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ต่อไป

โดยเชื้อราที่นำมาทำการวิจัยในครั้งนี้คือ เชื้อราสกุล *Mortierella* เนื่องจากมีงานวิจัยรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ไว้ดังต่อไปนี้ เชื้อราสกุล *Mortierella* สายพันธุ์ USF-406 ผลิตสารประกอบฟีนอลใหม่ N- (4,6-dihydroxy-2,3,5- trimethylbenzoyl) -glycine ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเชื้อราสกุล *Mortierella* (Hirota และคณะ, 2014) และสารสกัดจากเชื้อรา *M. alpina* ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยทดสอบกับสารละลาย Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และพบว่ามีฤทธิ์การต้านการอนุมูลอิสระที่รุนแรงด้วยค่าร้อยละ 50 Inhibitory concentration (IC_{50}) ที่ 48.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Melo และคณะ, 2014) ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* เพิ่มเติม โดยการนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางด้านความงามจากสารสกัดของเชื้อราได้ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 บ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่แยกจากดิน

1.2.2 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบกับสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. Hyalina, M. capitata* และ *M. chlamydospora*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 บ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

1.3.2 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่สกัดจากตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) จากเชื้อรา *M. hyalina*, *M. capitata* และ *M. chlamydospora* และทำการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทดสอบกับสารละลาย DPPH และ ABTS

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพทางด้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*

1.4.2 ทราบประโยชน์และองค์ความรู้ที่ได้เป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ไปศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต เช่น ผลิตภัณฑ์ทางด้านเภสัชกรรมพวกผลิตภัณฑ์เสริมความงาม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราสกุล *Mortierella*

เชื้อรา *Mortierella* มีอยู่ประมาณ 90 สกุล (Ellis, 2016) โดยเชื้อรากลุ่มนี้เป็นพวกที่มีชีวิตอย่างอิสระ พบทั่วไปอย่างกว้างขวางในดิน และบนเศษซากพืชและสัตว์ในดิน หรืออินทรียวัตถุอื่นๆ ซึ่งเชื้อราชนิดนี้มีทั้งที่เป็นแบบผสมต่างเพศ (Heterothallic species) และแบบผสมตัวเอง (Homothallic species) พบว่าเชื้อราสกุล *Mortierella* สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและมีลักษณะซ้อนกันเป็นวงคลื่น เส้นใยมีสีขาวถึงสีเทาอ่อน (สุรพันธ์, 2546) สกุล *Mortierella* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ส่วนใหญ่โคโลนีมักเป็นสีขาวมีเส้นใยละเอียดไม่ฟู โคโลนีจะเจริญแผ่ไปตามพื้นที่ผิวอาหาร (วารียา, 2553) แสดงดังรูปที่ 2.1 อีกทั้งยังจัดเป็น Filamentous fungi ที่มีคุณสมบัติเป็น Oleaginous fungi คือ มีองค์ประกอบสำคัญภายในเซลล์เป็นลิปิด (Lipid) และมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง (Dry biomass) ทั้งยังมีความสามารถในการผลิต Polyunsaturated fatty acid (PUFAs) ที่มีความสำคัญ เช่น Gamma-linoleic acid, Arachidonic acid และ Eicosapentaenoic เป็นต้น

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะการเกิดโคโลนีของเชื้อราสกุล *Mortierella*

ที่มา: ณรรฐนนท์ และคณะ, 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 อนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Mortierella*

Phylum Zygomycota
Class Zygomycetes
Order Mucorales
Family Mortierellaceae
Genus *Mortierella*

(สุรพันธ์, 2546)

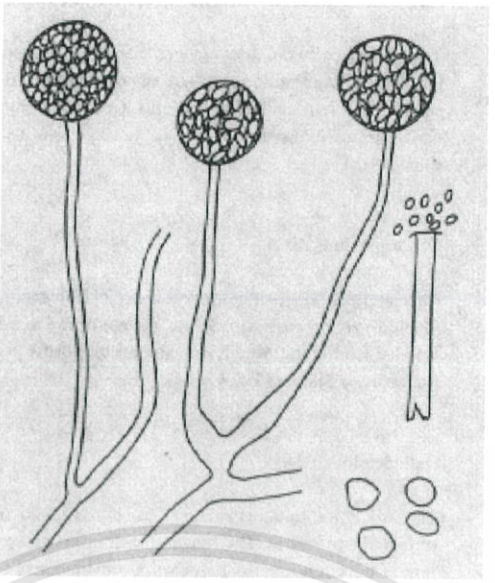
2.1.2 วงจรชีวิตของเชื้อราสกุล *Mortierella*

เชื้อราในสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี และเส้นใยมีการพัฒนาดีแล้วผนังเซลล์ประกอบด้วยสารไคโตซาน (Chitosan) และไคติน (Chitin) โดยการสืบพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Mortierella* มีระบบการสืบพันธุ์ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยแตกต่างกันตรงลักษณะการสร้างสปอร์ (spore) คือ สปอร์แบบอาศัยเพศ เรียกว่า ไซโกสปอร์ (Zygospore) และสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) โดยระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศพบได้บ่อยกว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงเป็นระยะที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิต และสำคัญต่อการใช้จำแนกเชื้อราสายพันธุ์นี้ (สุรพันธ์, 2546)

2.1.2.1 ระบบการสืบพันธุ์เชื้อราสกุล *Mortierella*

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเกิดขึ้นได้อย่างมากหลังจากที่เส้นใย (Hypha) เจริญเติบโตและแผ่ขยายไปทั่ว เส้นใยที่ให้กำเนิดอวัยวะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เรียก ก้านชูอับสปอร์ (Sporangiophore) จะเจริญอยู่บนเส้นใยและชูเส้นใยขึ้นไปในอากาศ (Aerial mycelium) และมักเบนเข้าหาแสง (Positively phototrophic) ก้านชูอับสปอร์อาจแตกกิ่งก้าน (Branched) หรือไม่แตกกิ่งก้าน (Simple) ส่วนปลายเป็นที่เกิดของ อับสปอร์ (Sporangium หรือ Sporangiolum) ที่อาจมีหรือไม่มี คอลัมเมลา (Columella) ผนังของอับสปอร์อาจคงสภาพ (Persistent) หรือง่ายต่อการแตกขาด หรือสลายตัวไปกับน้ำ (Diffluent) อาจมีหรือไม่มีผลึกของ Calcium oxalate รูปเข็มฐานกว้าง ก้านชูอับสปอร์ของเชื้อรา Mucorales มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมรูปไข่ หรือค่อนข้างเป็นทรงกระบอก มักมีผนังเรียบ ยกเว้นในบางสกุลที่มีผนังสปอร์ขรุขระเล็กน้อยหรือเป็นเส้นขีด (Striate) เมื่ออับสปอร์เจริญเต็มที่จะเปิดออกทำให้สปอร์ที่อยู่ภายในเกิดการแพร่กระจายออกสู่ภายนอกได้ ดังรูปที่ 2.2 เมื่อสปอร์ตกลงบนที่มีความชื้นและธาตุอาหารเพียงพอจะเกิดการงอก (Germ tube) และเจริญต่อไปเป็นเส้นใย แตกกิ่งก้านสาขา และสร้างอับสปอร์ ต่อไป (วิจัย, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

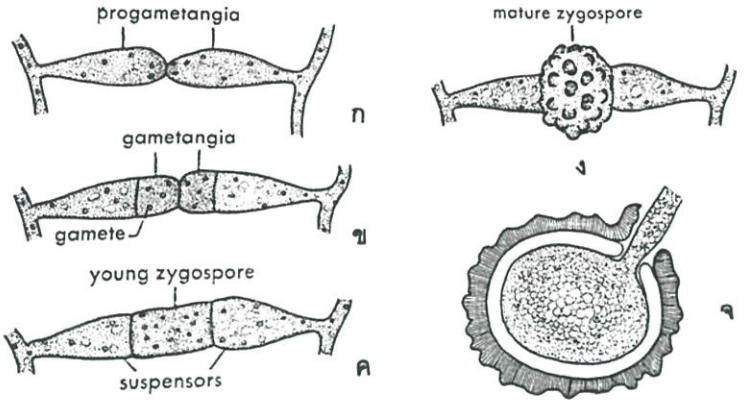


รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Mortierella*

ที่มา : http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Mortierella.html

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นการสร้างไซโกสปอร์ จะเริ่มต้นจากการรวมตัวกันของส่วนปลายของเส้นใยที่ต่างเพศกัน เมื่อเส้นใยทั้งสองรวมตัวกันจะเกิดเป็นโปรแกมีแทนเจีย (Progametangia) ที่มีลักษณะคล้ายถ้วย จากนั้นส่วนปลายของเส้นใย ที่เรียกว่า แกมีแทนเจีย (Gametangia) ของทั้งสองเพศจะหลอมรวมกัน และนิวเคลียสของทั้งสอง แกมีแทนเจียจะรวมตัวกันเกิดเป็นไซโกต (Zygote) หลังจากนั้นจะมีการสร้างผนังหนาสีน้ำตาลขึ้นมาหุ้มไซโกตไว้เกิดเป็นไซโกสปอร์ ที่สมบูรณ์เมื่อเกิดการงอกของสปอร์ โพรไมซีเลี่ยม (Promycelium) จะแทงผ่านผนังของไซโกสปอร์ออกมา ที่ส่วนปลายของโพรไมซีเลี่ยมจะประกอบด้วย Sporangia ที่ภายในบรรจุสปอร์ของเชื้อราที่พร้อมจะงอกเป็นไมซีเลียม (Mycelium) ใหม่ต่อไป ดังรูปที่ 2.3 (วิจัย, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา (นงลักษณ์, 2553)

ระยะ ก – ง เป็นการสร้างไซโกสปอร์

ระยะ จ เป็นระยะที่ไซโกสปอร์งอก

2.1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา *Mortierella*

สุภานัน สุขศิริ (2561) ได้ทำการแยกเชื้อราทั้งหมด 13 ไอโซเลต ที่มีแนวโน้มบ่งชี้เป็นเชื้อราสกุล *Mortierella* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการจัดเรียงของเส้นใยที่แตกต่างกัน และทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Mortierella* ผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา *M. capitata* ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีลักษณะเส้นใยสีขาวและการเจริญของโคโลนีเรียงต่อกัน ลักษณะคล้ายรูปดอกกุหลาบชัดเจน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกั้น และมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบรูปร่างวงรี เชื้อรา *M. chlamydospora* ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีลักษณะเส้นใยสีขาว ฟู แต่ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสี มีผนังกั้น และมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบรูปร่างทรงกลม เชื้อรา *M. hyalina* ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีลักษณะเส้นใยสีขาวการเจริญของเส้นใยซ้อนกันคล้ายดอกกุหลาบที่มีกลีบติดกัน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกั้น และมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบรูปร่างวงรี

Vadivelan และ Venkateswaran (2014) ศึกษาเชื้อราสกุล *Mortierella* สามารถคัดแยกได้โดยวิธีการเจือจางดิน และมีลักษณะเส้นใยเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น โครงสร้างของก้านชูอับสปอร์ทั้งหมดมีโครงสร้างที่ไม่มีกิ่งก้าน ซึ่งวัดความยาวได้ระหว่าง 20 ถึง 120 ไมครอนโดยมีฐานที่กว้างและไม่สม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thuong และคณะ (2019) ศึกษาเชื้อรา *Mortierella horticola* โดยลักษณะของโคโลนีจะมีสีขาว มีรูปร่างคล้ายดอกกุหลาบกลีบซ้อนกัน ด้านหลังของโคโลนีจะมีสีขาว การจัดเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ อับสปอร์ และก้านชูสปอร์ โดยทั่วไปนั้นไม่ได้รับการตรวจพบแม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีการเจริญของเส้นใยที่ดี ก้านชูสปอร์จะไม่แตกกิ่งก้าน อับสปอร์จะถูกสร้างขึ้นเมื่อทำการเลี้ยงผ่านไปแล้วเป็นเวลา 7 วัน อับสปอร์จะมีลักษณะกลมมีขนาดความกว้าง x ความยาวเท่ากับ 12-20 x 12-19 ไมโครเมตร สปอร์มีลักษณะกลมเรียบมีขนาดความกว้าง x ความยาวเท่ากับ 4.90-5.40 x 4.90-5.80 ไมโครเมตร

Dil และคณะ (2015) ค้นพบเชื้อรา *Mortierella* สายพันธุ์ใหม่ จำนวนสามสายพันธุ์ คือ *M. zychae*, *M. ambigua* และ *M. indohii* โดยพบเชื้อราในระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มเชื้อราที่แยกได้ตัวอย่างดินที่รวบรวมจากสถานที่ต่าง ๆ ในประเทศเกาหลี โดยทั้งสามสายพันธุ์ ถูกระบุด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยสังเกตุลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยลักษณะของการเจริญของโคโลนี ลักษณะเส้นใยโคโลนี ลักษณะอับสปอร์และสปอร์ และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิกระดับโมเลกุลของเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

โดยโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ *M. ambigua* โคโลนีเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปานกลางใน Potato Dextose Agar (PDA) โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 64-68 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้านหน้าและด้านหลังของโคโลนีมีสีขาวนวลและไม่มีพู เส้นใยในอากาศก่อตัวขึ้นเป็นเหมือนลูกปัด เส้นใยที่มีรูปร่างบวมและมีสปอร์น้อยมาก ก้านชูอับสปอร์นั้นมีลักษณะเป็นสีใส ตั้งตรง และเรียบง่าย มีความยาว 25-450 ไมโครเมตร เรียวไปทางยอด ที่ฐานมีความกว้าง 7-25 ไมโครเมตร และที่ปลายยอดมีความกว้าง 2-5 ไมโครเมตร มีอับสปอร์ขั้วเดี่ยว ก้านชูสปอร์หลักมักเกิดขึ้นโดยไม่มีอับสปอร์ อับสปอร์นั้นเป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-35 ไมโครเมตร มีลักษณะผิวมีรอยย่นและไม่มีฐานแกน สปอร์มีรูปร่างกลมถึงรูปกลมรูปเดี่ยวและขนาด 2.5-5.5 ไมโครเมตร สปอร์ที่สร้างจากเส้นใยโดยตรงมีสีน้ำตาลกลมโต มีผนังหนาและมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 19-30 ไมโครเมตร และโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ *M. Indohii* โคโลนีมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหาร PDA มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 70-73 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โคโลนีมีสีขาวเหมือนหิมะและมีการเจริญเป็นแนวในวงกว้างพร้อมเส้นใยที่เจริญไปในอากาศ ด้านหลังของโคโลนีเป็นสีขาวอมเหลือง ด้านหน้าของโคโลนีเป็นสีขาวนวลและมีลักษณะแนวค่อนข้างแคบ พื้นผิวของโคโลนีปรากฏเป็นด่างเพราะมีสไตโลสปอร์จำนวนมาก สปอร์มีมาก ก้านชูสปอร์หายไป ก้าน Stylosporebearing ลักษณะชะลูด บอบบาง ไม่แต่งกิ่งก้าน และบางครั้งก็มีลักษณะบวมที่ปลาย ก้านมีความยาว 50-160 ไมครอนและกว้าง 1.5-2.5 ไมครอน สไตโลสปอร์นั้นเกือบเป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12-18 ไมครอน มีผนังหนาและปกคลุมไปด้วยหนามอันบอบบาง และโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ *M. zychae* โคโลนีเติบโตอย่างรวดเร็วปานกลางบนอาหาร PDA โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 76-79 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้านหน้าของอาณานิคมเป็นสีขาวและมักเป็นสีขาวเข้มตรงกลาง ด้านหลังของอาณานิคมเป็นสีขาวอมเหลืองและมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวแคบ การผลิตเส้นใยในอากาศเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางที่ศูนย์กลางของโคโลนีและเกิดการพองตัวเหมือนลูกปัดที่มีรูปร่างบวมจำนวนมาก การเกิดสปอร์มีจำนวนมาก และเส้นใยมีกลิ่นเหมือนกระเทียม ก้านชูสปอร์นั้นมีลักษณะใส ตั้งตรง และเรียบ มีความยาว 190-1,000 ไมโครเมตร เรียวไปทางยอดและที่ฐานมีความกว้าง 8-12 ไมโครเมตร และ 2-4 ไมโครเมตร ที่ปลายยอดของอับสปอร์ อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-35 ไมโครเมตร รอยย่นและไม่มีฐาน ก้านชูสปอร์มีลักษณะเป็นสีใส รูปวงรี เซลล์เดียว และขนาด 6-10 ไมโครเมตร × 4-6 ไมโครเมตร สปอร์ที่เกิดจากเส้นใยมีลักษณะเป็นรูปกลมกระจัดกระจาย และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-19 ไมโครเมตร

2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้นสามารถทดสอบได้หลากหลายวิธี โดยในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ วิธี DPPH และวิธี ABTS โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบกับสารละลาย 2,2- Diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH) (จัตุพล และคณะ, 2554)

วิธี DPPH เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) โดยใช้สารตั้งต้น คือ สารละลาย DPPH โดยมีหลักการคือ DPPH เป็น Stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (Methanol) สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) โดย DPPH● จะเกิดปฏิกิริยากับ Antioxidant (AH) หรือกับ Radical species (R●)

DPPH● + AH----------DPPH-H + A●

DPPH● + R●---------- DPPH-R

เมื่อ DPPH● ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง โดยรายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละ 50 Inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH● ลดลงร้อยละ 50 โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาค่า IC_{50} จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 แล้วใช้ค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) คำนวณ % Radical Scavenging (ร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

$$\% \text{ Radical Scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบกับสารละลาย 2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonicacid] (ABTS) (จัตุพล และคณะ, 2554)

สารละลาย ABTS เป็นสารที่คงตัว แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารละลาย Potassium peroxide จะทำให้สารละลาย ABTS เปลี่ยนไปเป็นอนุมูล ABTS+• ที่มีสีฟ้าเขียว ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการทำปฏิกิริยาจะทำให้อนุมูล ABTS+• เปลี่ยนกลับมาเป็น ABTS ทำให้การดูดกลืนแสงลดลงโดยรายงานผลการทดลองเป็นค่าร้อยละ 50 Inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS ลดลงร้อยละ 50 โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาค่า IC_{50} จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 แล้วใช้ค่า IC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC) คำนวณ % Radical Scavenging (ร้อยละการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ)

$$\% \text{ Radical Scavenging} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ ABTS

AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย ABTS

2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

Hirota และคณะ (2014) ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์แอนตาร์กติก (The Antarctic endophytic fungus) (สายพันธุ์ ITA1-CCMA 952) ถูกแยกออกจากมอสส์ *Schistidium antarctici* ที่พบในอ่าว Admiralty เกาะ King George, แอนตาร์กติกา เชื้อราสายพันธุ์ ITA1-CCMA 952 ทำการระบุสายพันธุ์ตรงกับเชื้อรา *Mortierella alpina* โดยการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการตามลำดับยีน 18S rRNA เชื้อราสายพันธุ์นี้มีการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid, PUFAs) ในระดับสูงรวมถึงกรดแกมมาไลโนเลนิก (Gamma linolenic acid, GLA) และกรดอะราคิโดนิก (Arachidonic acid, AA) ซึ่งเมื่อรวมกันจะแสดงถึงร้อยละ 48.3 ของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด

Melo และคณะ (2014) ศึกษาสารสกัดจากเชื้อรา *Mortierella alpina* แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่รุนแรงด้วยค่า IC_{50} ที่ 48.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่รุนแรงซึ่งส่วนใหญ่ต่อต้านแบคทีเรียดังต่อไปนี้ *Escherichia coli* โดยมีค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 26.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Enterococcus faecalis* เชื้อแบคทีเรียทั้งสองมีค่า MIC เท่ากับ 107 ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเชื้อ *Mortierella alpina* สายพันธุ์ ITA1 CCMA 952 เป็นเชื้อราที่มีแนวโน้มสำหรับการผลิตสารทางชีวภาพของยาปฏิชีวนะ สารต้านอนุมูลอิสระ และ PUFAs การศึกษาครั้งนี้เน้นความจำเป็นในการวิจัยเพิ่มเติมในสภาพแวดล้อมที่รุนแรง เช่น ทวีปแอนตาร์กติกา การผลิตสารประกอบฟีนอลเหล่านี้ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเชื้อราชนิดเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างดิน

ได้รับความอนุเคราะห์ดิน NTS-18-001 จาก ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ เก็บตัวอย่างดินจากน้ำตกทีลอซู อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก วันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2561 โดยขุดดินบริเวณผิวหน้าออกลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ทำการตักดินใส่ถุงตัวอย่าง

3.2 ตัวอย่างเชื้อ

3.2.1 เชื้อราที่ใช้ในการวิจัยได้รับความอนุเคราะห์ จาก รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ได้แก่

3.2.1.1 *Mortierella chlamydospora* (CHP28-S05)

3.2.1.2 *Mortierella hyalina* (CHP33-S06)

3.2.1.3 *Mortierella capitata* (CHP06-S03)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อรา

3.3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

3.3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)

3.3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Water agar (WA)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

3.3.2.1 สารละลายเมทานอล (Methanol)

3.3.2.2 สารละลายเฮกเซน (Hexane)

3.3.2.3 สารละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

3.3.3.1 สารละลาย 2,2-Diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH)

3.3.3.2 สารละลายเมทานอล (Methanol)

3.3.3.3 สารละลาย 2,2'-Azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS)

3.3.3.4 สารละลาโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.5 สารละลายโทรลอกซ์ (Trolox)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 Autoclave

3.4.2 Duran bottle

3.4.3 Forceps

3.4.4 Hot air oven

3.4.5 Incubator

3.4.6 Laminar air flow

3.4.7 Loop

3.4.8 Micropipette set

3.4.9 Microplate reader

3.4.10 Microwave

3.4.11 Needle

3.4.12 Rotary evaporator

3.4.13 Separating funnel

3.4.14 Slide and cover slit

3.4.15 Spatula

3.4.16 Spectrophotometer

3.4.17 Spin down

3.4.18 Light microscope

3.4.19 Sterio microscope

3.4.20 Syringes and needle size 25G×1 ”

3.4.21 Test tube size 1.5 and 2.0 millimeters

3.4.22 Tip

3.4.23 Tissue culture bottle

3.4.24 Vernier caliper

3.4.25 Vortex mixer

3.4.26 Water bath

3.4.27 Filter paper (Whatman No.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella*

คัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* จากตัวอย่างดินที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ด้วยวิธี Soil dilution plate (Vadivelan และ Venkateswaran, 2014) ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายดินกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ระดับความเจือจาง 100 เท่า ปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจาง 100 เท่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ตามด้วยการใช้วิธี Spread plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการสังเกตโคโลนีที่ปรากฏทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เมื่อปรากฏโคโลนีของเชื้อราใช้เข็มเขี่ยแต่ละโคโลนีวางลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.5.2 การบ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สำหรับเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะโคโลนี เส้นใยมีลักษณะที่ละเอียดมีสีขาว ฟูโคโลนีจะเจริญแผ่ไปตามพื้นผิวของอาหาร การเจริญโคโลนีมีลักษณะซ้อนกันเป็นวงคลื่น และโคโลนีเรียงต่อกันลักษณะคล้ายรูปดอกกุหลาบ หรือการเจริญของเส้นใยซ้อนกันคล้ายดอกกุหลาบที่มีกลีบติดกัน หรือมีลักษณะ โคโลนีเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกั้น และก้านชูสปอร์จะไม่มีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ที่พบอาจเป็นแบบเดี่ยวหรือแบบแตกแขนง โครงสร้างของก้านชูอับสปอร์ทั้งหมดมีโครงสร้างที่ไม่มีกิ่งก้าน ที่บริเวณปลายของอับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลม และมีลักษณะของสปอร์เป็นแบบรูปร่างวงรี หรือลักษณะของสปอร์เป็นแบบรูปร่างทรงกลม (สุรพันธ์, 2546 ; วาริยา, 2553 ; Vadivelan และ Venkateswaran, 2014 ; สุภานัน, 2561)

3.5.2.1 การเตรียมเทคนิค Slide culture เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* โดยเทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งให้เย็นและผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้มีดจุ่มเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างไม่เกินด้านละประมาณ 6 มิลลิเมตร ใช้มีดที่เผาไฟยกชิ้นวุ้นที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มาวาง 4 มุมบนจานเพาะเชื้อ และใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น นำกระจกปิดสไลด์ที่ผ่านไฟ 3-4 ครั้ง ค่อย ๆ วางปิดชิ้นวุ้น บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของเชื้อราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์หรือเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วันนำกระจกปิดสไลด์มาวางลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดน้ำยา Lactophenol cotton blue และที่ไม่ได้หยดน้ำยาไว้ ปิดทับขอบกระจก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ แล้วนำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และถ่ายรูปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.5.3 การสกัดสารจากเชื้อราสกุล *Mortierella* (สุภานัน, 2561)

นำเชื้อราที่แยกได้ไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 120 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน นำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยแห้งนำเส้นใยมาบด จากนั้นนำไปแช่กับตัวทำละลายเฮกเซน เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ จะได้สารสกัดชั้นเฮกเซน นำกากที่ได้ชั้นเฮกเซน ไปทำการแช่ต่อในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศ จะได้สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท นำกากที่ได้ชั้นเอทิลอะซิเตท ไปทำการแช่ต่อในตัวทำละลายเมทานอล เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันสุญญากาศจะได้สารสกัดเมทานอล

3.5.4 การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

3.5.4.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH) (Hirota และคณะ, 2014)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ละลายในเมทานอล และเตรียมสารสกัดตัวอย่างที่ผสมกับเมทานอลที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ผสมสารสกัดตัวอย่างกับ DPPH ในไมโครเวลเพลทจำนวน 96 ช่อง ช่องละ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุม นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] * 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Trolox ในเมทานอล เข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (บังอร และศศิลักษณ์, 2549) และคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยเทียบเท่ากับสารละลาย Trolox (Trolox equivalent antioxidant activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) (Chen และคณะ, 2018)

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ โดยผสมสารละลาย ABTS กับสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ในอัตราส่วน 1:0.5 แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เจือจางสาร ABTS ด้วยเมทานอลให้ค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 ทดสอบกับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร กับสารละลาย ABTS ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96 - well plate) ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A \text{ control} - A \text{ sample})/A \text{ control}] * 100$$

จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย โทรลอกซ์ ในเมทานอล เข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (บังอร และศศิลักษณ์, 2549) และคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยเทียบเท่ากับสารละลาย (Trolox equivalent antioxidant activity)

3.5.4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab Version 18 โดยใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล Factorial Design (FD) และ แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ที่ระดับความชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่า $P \leq 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลองใช้วิธีการวางแผนการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

1.การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลองอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล Mortierella ใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD)

2.การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลองผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของเชื้อรา *Mortierella capitata, M. chlamydospora* และ *M. hyalina* ใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล Factorial Design (FD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella*

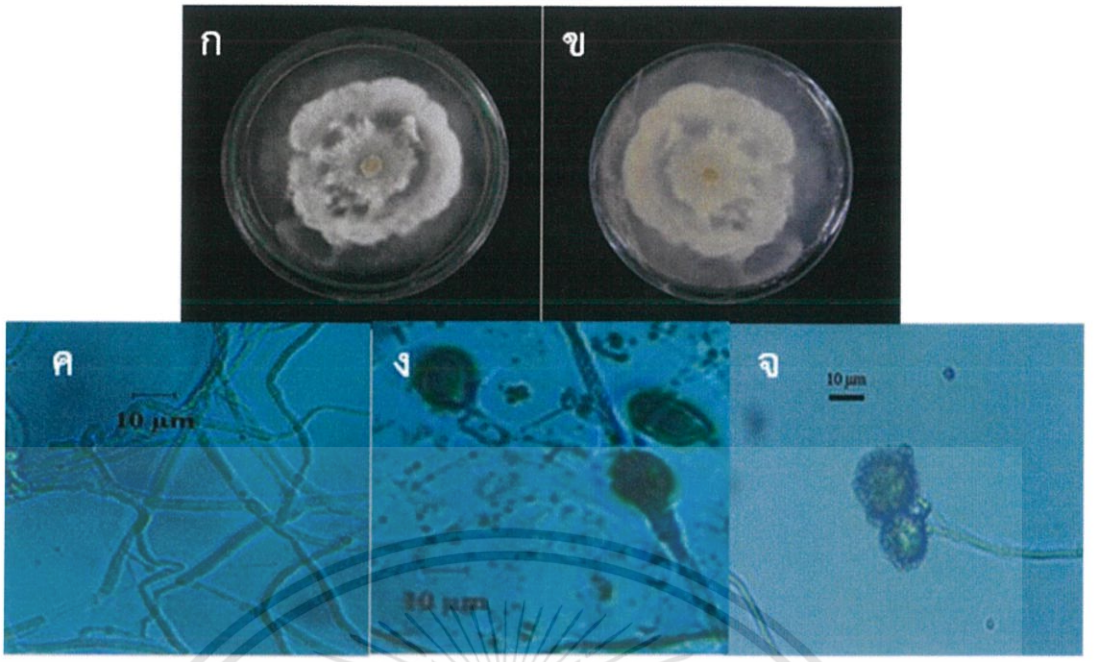
จากตัวอย่างดิน NTS-18-001 พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ได้จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่างคือ TLS01-01 และ TLS01-02 โดยมีการเจริญเติบโตของโคโลนีแบบดอกกุหลาบ (Rose) จากลักษณะของโคโลนีสามารถแบ่งออกได้ ตามลักษณะการจัดเรียงของเส้นใยที่แตกต่างกันและได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราสกุล *Mortierella* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *M. hyalina* (CHP33-S06), *M. chlamydospora* (CHP28-S05) และ *M. capitata* (CHP06-S03) โดยมีรายละเอียดของเชื้อราสกุล *Mortierella* ดังนี้

4.1.1 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella*

เชื้อราสกุล *Mortierella* ที่ได้รับการอนุเคราะห์มาจำนวน 3 ไอโซเลต ได้รับการระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลแล้วว่า ไอโซเลต CHP06-S03 คือเชื้อรา *M. capitata* ไอโซเลต CHP28-S05 คือเชื้อรา *M. chlamydospora* และไอโซเลต CHP33-S06 คือ เชื้อรา *M. hyalina* เมื่อนำเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยจะศึกษารูปร่างโคโลนีด้านหน้าด้านหลัง เส้นใย สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (Chlamydospore) ก้านชูอับสปอร์ (Sporangiophore) และอับสปอร์ (Sporangium) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) เชื้อรา *M. chlamydospora* (CHP28-S05) ลักษณะของเชื้อรามีเส้นใยสีขาว ฟู ขอบของโคโลนีแสดงลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.1 ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.1 ข) ของตัวอย่าง CHP28-S05 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.1 ค) และอับสปอร์ มีรูปร่างกลม (รูปที่ 4.1 ง) ขนาดอับสปอร์ มีขนาดความกว้าง × ความยาว เท่ากับ 11.25±1.25 × 11.17±1.54 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.1 จ) ค่าขนาดของอับสปอร์แสดงดังตารางที่ 4.1

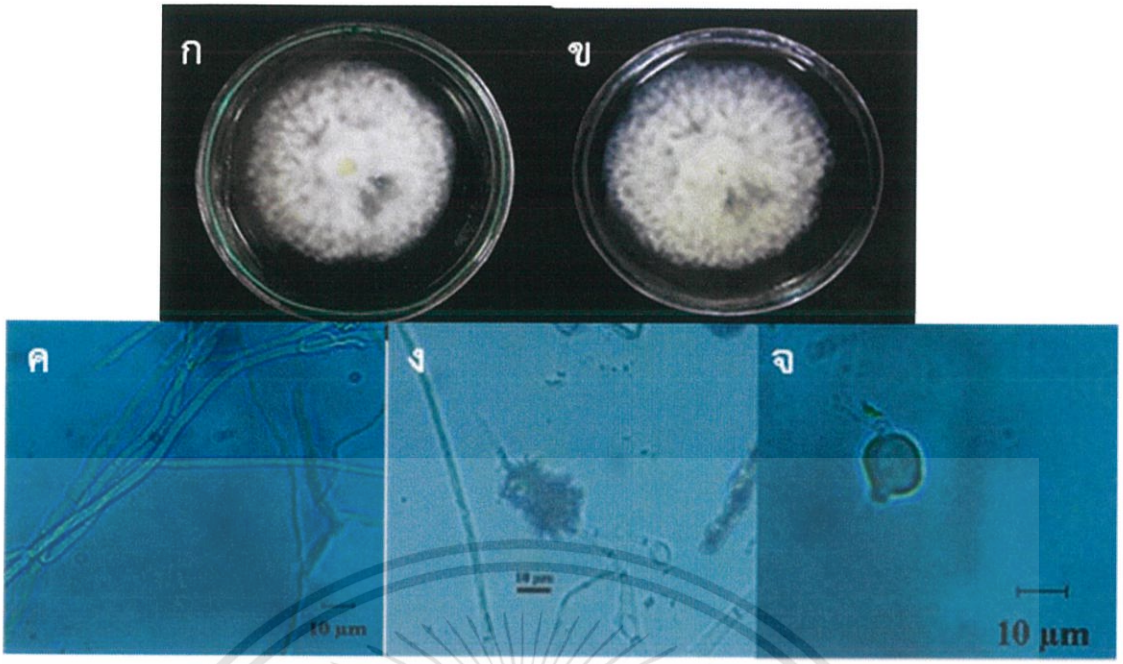
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M. chlamydospora* (CHP28-S05) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี (ก) ด้านหลังโคโลนี (ข) เส้นใยของเชื้อรา (ค) สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (ง) ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์ (จ)

2) เชื้อรา *Mortierella capitata* (CHP06-S03) ลักษณะของเชื้อรามีเส้นใยสีขาว เส้นใยมีการเรียงตัวกันลักษณะเป็นดอกกุหลาบ โดยเส้นใยมีการเจริญซ้อนกัน และชิดติดกัน โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.2 ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.2 ข) ของตัวอย่าง เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสีไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.2 ค) อับสปอร์มีรูปร่างเป็นแบบวงรี (รูปที่ 4.2 ง) ขนาดอับสปอร์ มีขนาดความกว้าง × ความยาวเท่ากับ 15.27±1.58 × 8.94±2.02 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.2 จ) ค่าขนาดของอับสปอร์แสดงดังตารางที่ 4.1

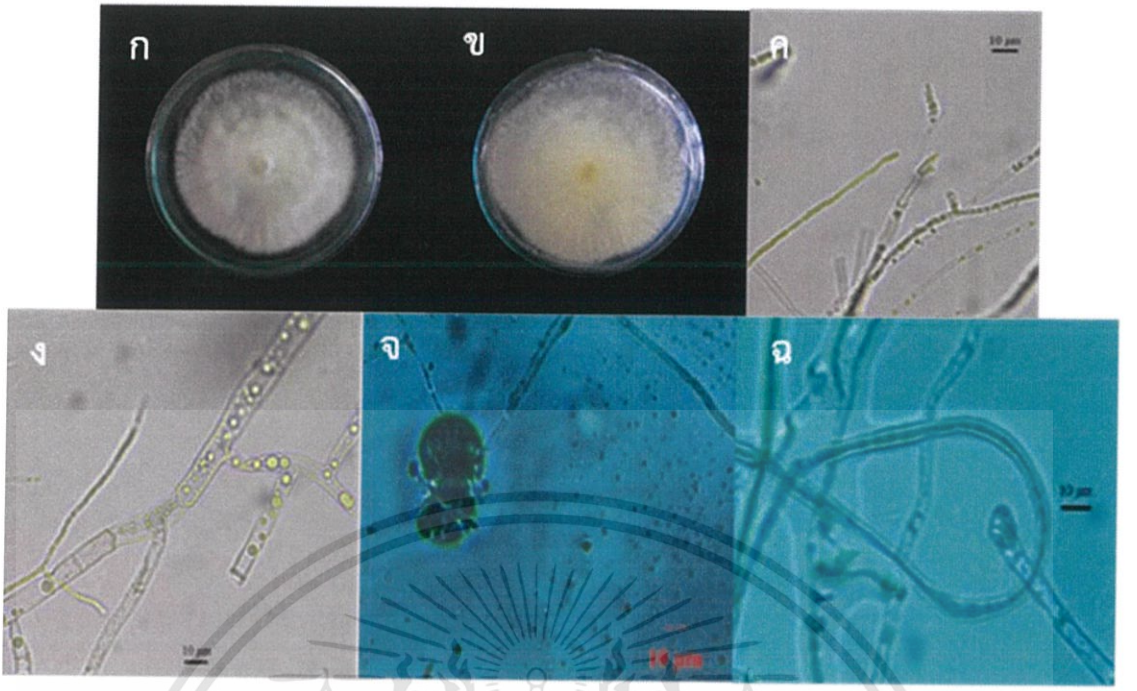
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *M. capitata* (CHP06-S03) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี (ก) ด้านหลังโคโลนี (ข) เส้นใยของเชื้อรา (ค) สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (ง) อับสปอร์ (จ)

3) เชื้อรา *Mortierella hylina* (CHP33-S06) ลักษณะของเชื้อรามีเส้นใยสีขาว และมีการเจริญของเส้นใยเรียงตัวกันเป็นรูปดอกกุหลาบ ที่มีเส้นใยต่อกันคล้ายลักษณะกลีบติดกัน โดยมีลักษณะโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.3 ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.3 ข) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.3 ค) อับสปอร์มีรูปร่างเป็นแบบวงรี (รูปที่ 4.3 ง) ขนาดอับสปอร์มีขนาดความกว้าง × ความยาว เท่ากับ 13.36±2.82 × 9.50±2.73 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.3 จ) ค่าขนาดของอับสปอร์แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

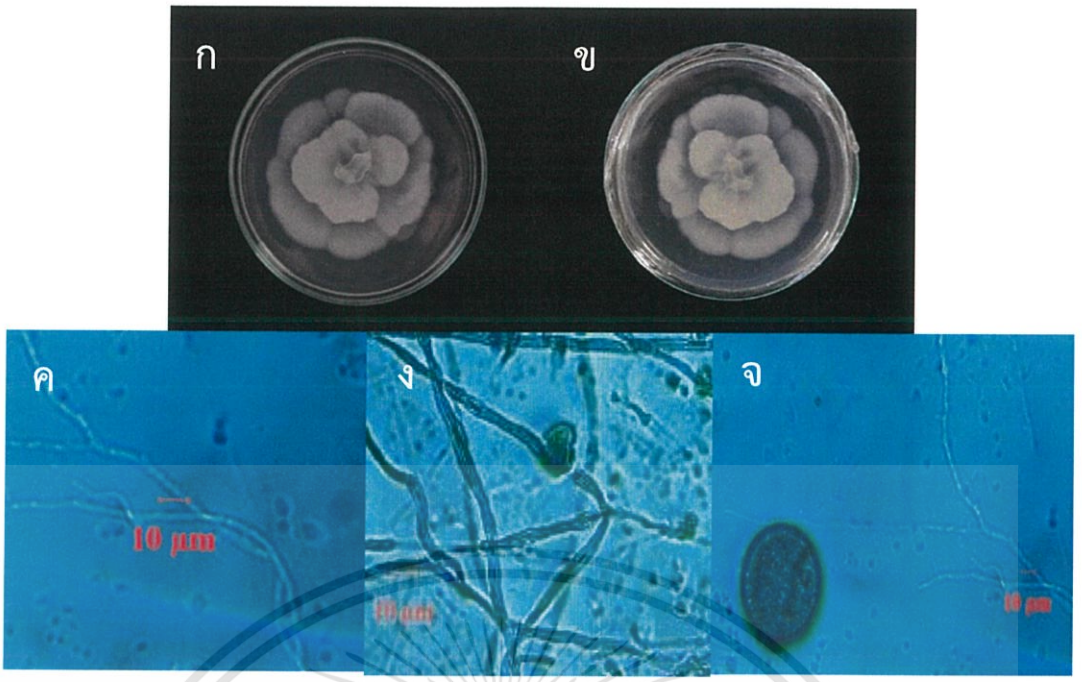


รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *M. hyalina* (CHP33-S06) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี (ก) ด้านหลังโคโลนี (ข) เส้นใยของรา (ค) เส้นใยที่มีหยดน้ำมัน (ง) สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (จ) ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์ (ฉ)

4.1.2 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella* ไอโซเลต TLS01-01

ลักษณะของเชื้อรามีเส้นใยสีขาว ฟู ขอบของโคโลนีแสดงลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ มีแนวโน้มเป็นเชื้อรา *M. chlamydospora* (CHP28-S05) โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.4 ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.4 ข) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.4 ค) และอับสปอร์ มีรูปร่างวงรี (รูปที่ 4.4 ง) ขนาดอับสปอร์ มีขนาดความกว้าง × ความยาวเท่ากับ 15.53±2.47 × 13.57±1.43 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4 จ) ค่าขนาดของอับสปอร์แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

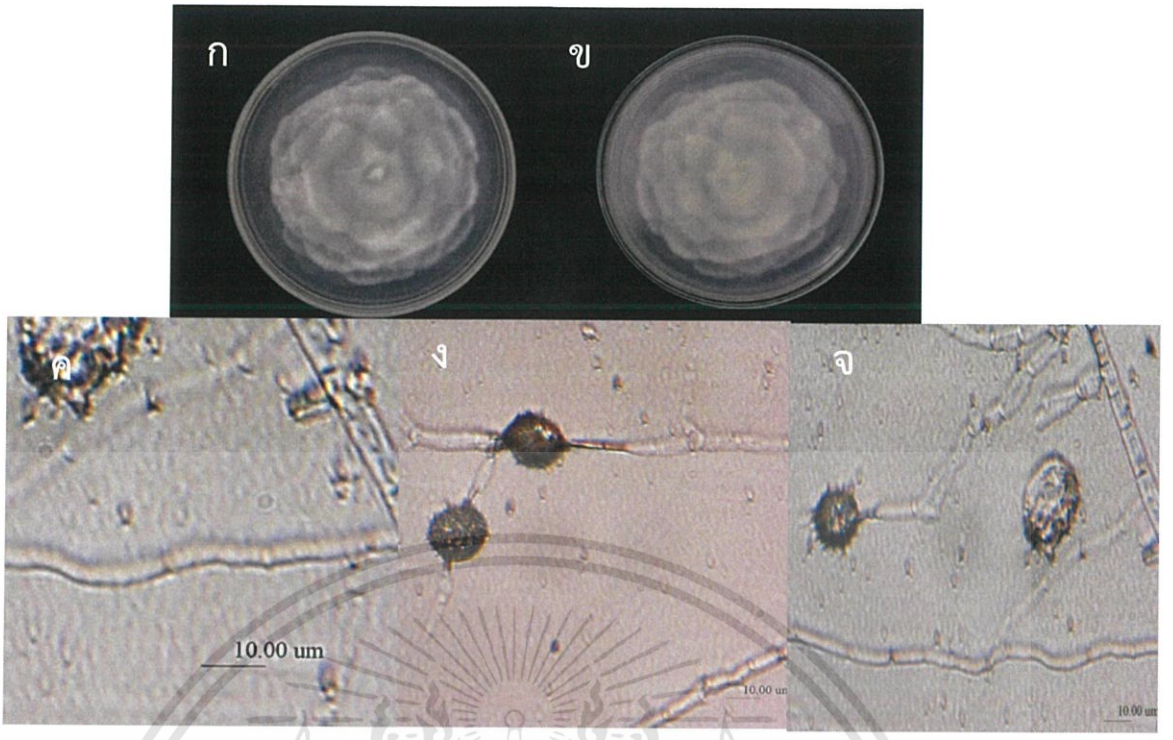


รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TlS01-01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี (ก) ด้านหลังโคโลนี (ข) เส้นใยของเชื้อรา (ค) สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (ง) อับสปอร์ (จ)

4.1.3 ลักษณะของเชื้อราสกุล *Mortierella* ไอโซเลต TLS01-02

ลักษณะของเชื้อรามีเส้นใยสีขาว เส้นใยมีการเจริญซ้อนกันทำให้มองเห็นคล้ายกลีบกุหลาบซ้อนกัน มีแนวโน้มเป็นเชื้อราสกุล *Mortierella* โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.5 ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.5 ข) ของตัวอย่าง เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น (รูปที่ 4.5 ค) ในกลุ่มนี้ อับสปอร์ มีรูปร่างเป็นแบบรูปกลม (รูปที่ 4.5 ง) ขนาดอับสปอร์ของ มีขนาดความกว้าง × ความยาว เท่ากับ 15.41±2.23 × 13.55±2.64 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.5 จ) ค่าขนาดของอับสปอร์แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน ด้านหน้าโคโลนี (ก) ด้านหลังโคโลนี (ข) เส้นใยของเชื้อเชื้อรา (ค) สปอร์ที่อยู่ติดกับเส้นใย (ง) ก้านชูอับสปอร์ และอับสปอร์ (Sporangium) (จ)

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของอับสปอร์ของเชื้อราสกุล *Mortierella* จำนวน 5 ไอโซเลต

รหัสไอโซเลต	ขนาดของอับสปอร์ (µm) ± SE	
	ความกว้าง	ความยาว
CHP33-S06	13.36±2.82	9.50±2.73
CHP28-S05	11.25±1.25	11.17±1.54
CHP06-S03	15.27±1.58	8.94±2.02
TLS01-01	15.53±2.47	13.57±1.43
TLS01-02	15.41±2.23	13.55±2.64

หมายเหตุ : ± SE คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella*

จากการศึกษาการเจริญโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 5 วัน แสดงผลดังตารางที่ 4.2 เมื่อนำค่าที่ได้มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ดังนี้ CHP28-S05, CHP33-S06, TLS01-01, CHP06-S03 และ TLS01-02 มีค่าอัตราการเจริญ เท่ากับ 5.74, 6.62, 7.04, 10.36 และ 11.30 มิลลิเมตรต่อวันตามลำดับ จากการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า TLS01-02 มีอัตราการเจริญของเชื้อราที่สูงที่สุด และ CHP28-S05 มีอัตราการเจริญของเชื้อราที่ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ของเชื้อราสกุล *Mortierella*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต อาจกล่าวได้ว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินรหัส TLS01-01 มีลักษณะเส้นใยสีขาว ฟู ขอบของโคโลนีแสดงลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุภานัน (2561) โดยมีลักษณะโคโลนีมีสีขาว ลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้ เส้นใยไม่มีสี เส้นใยจะมีการแตกกิ่งก้าน เป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น อับสปอร์ มีลักษณะปลายเป็นทรงกลม มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wani และคณะ (2017) จึงกล่าวได้ว่ามีความน่าจะเป็นเชื้อรา *M. chlamydospora* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน และเชื้อราที่แยกได้จากดินรหัส TLS01-02 เส้นใยมีสีขาวลักษณะของโคโลนีเรียงซ้อนกันเป็นรูปดอกกุหลาบที่ชัดเจนซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุภานัน (2561) โดยที่ลักษณะโคโลนีมีสีขาว โคโลนีจะเจริญแผ่ไปตามพื้นผิวของอาหาร เส้นใยมีลักษณะที่ละเอียดก้านชูสปอร์จะไม่มีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ที่พบเป็นแบบแตกแขนง ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของวารียา (2553) จึงกล่าวได้ว่ามีความน่าจะเป็นเชื้อราสกุล *Mortierella* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *M. capitata, M. chlamydospora* และ *M. hyalina* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษา และจากการสืบค้นเพิ่มเติมพบว่ามีความน่าจะเป็นเชื้อรา *M. horticola* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ลักษณะของโคโลนีมีสีขาว มีรูปร่างคล้ายดอกกุหลาบกลีบซ้อนกัน ด้านหลังของโคโลนีจะมีสีขาว การจัดเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ ก้านชูสปอร์จะไม่แตกกิ่งก้าน และอับสปอร์จะมีลักษณะกลม มีขนาดความกว้าง x ความยาว เท่ากับ 12.00-20.00 x 12.00-19.00 ไมโครเมตร (Thuong และคณะ, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* ทั้ง 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ณ ระยะเวลาต่าง ๆ

การเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella*						อัตราการเจริญของเชื้อราสกุล *Mortierella* ในเวลา 1 วัน
รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร) ± SE					
	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	
CHP33-S06	12.69 ±0.86	21.66 ±1.08	30.78 ±1.23	37.87 ±1.35	46.05 ±1.37	6.67^{bc} ±1.18
CHP28-S05	11.42 ±0.53	18.72 ±0.88	26.13 ±1.65	33.02 ±1.37	40.11 ±1.67	5.74^{c} ±1.22
CHP06-S03	24.94 ±0.78	41.23 ±0.94	58.56 ±2.00	71.74 ±1.25	76.76 ±1.33	10.36^{ab} ±1.26
TLS01-01	19.40 ±1.70	29.62 ±2.19	38.50 ±0.97	48.74 ±2.06	54.60 ±2.24	7.04^{bc} ±1.82
TLS01-02	21.13 ±0.59	37.82 ±0.04	53.77 ±0.56	69.45 ±0.20	77.61 ±0.18	11.30^{a} ±0.31

หมายเหตุ : ± SE คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

a-d แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) ในแนวตั้ง

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของเชื้อรา *M. capitata, M. chlamydospora* และ *M. hyalina*

4.2.1 การทดสอบด้วยสารละลาย DPPH (DPPH scavenging activity)

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH ครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารจากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลได้ออกมาเป็นสารสกัด 9 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังตารางที่ 4.3 จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ พบว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อราไอโซเลต *M. capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyalina* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 50 แต่เนื่องจากสารสกัดที่สกัดได้จากเชื้อรา *M. chlamydospora* ในชั้นนี้มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมาก ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่มีความน่าเชื่อถือ จึงไม่นำข้อมูลมาใช้ หลังจากนั้นนำสารสกัดในชั้นเมทานอลของเชื้อรา 2 ไอโซเลตนี้มาเจือจางความเข้มข้นเป็นสองเท่า ได้แก่ ความเข้มข้น 2,000, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังตารางที่ 4.4 เพื่อหาค่า IC_{50} โดยสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* มีค่า IC_{50} ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 เท่ากับ 2,394 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. hyalina* มีค่า 2,522 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดในชั้นเฮกเซนของเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ -2.90 ± 0.34 และ -5.09 ± 1.48 และสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทของเชื้อรา *M. chlamydospora* และ *M. hyalina* มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ -2.46 ± 3.62 และ -0.82 ± 1.74 ตามลำดับ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ย เมื่อวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เท่ากับ 5.27 ± 0.85 และ 5.00 ± 0.19 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*

ตัวทำละลาย	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE		
	M. capitata	*M. chlamydospora*	*M. hyalina*
Hexane	$-2.90^{c} \pm 0.34$	$1.15^{c} \pm 2.94$	$-5.09^{c} \pm 1.48$
Ethyl acetate	$0.33^{c} \pm 2.12$	$-2.46^{c} \pm 3.62$	$-0.82^{c} \pm 1.74$
Methanol	$71.59^{a} \pm 1.24$	$54.30^{b} \pm 4.20$	$59.17^{b} \pm 2.05$

หมายเหตุ : ± SE = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

a-c แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ในชั้นเมทานอล

ความเข้มข้น	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ± SE	
	M. capitata	*M. hyalina*
500	$1.85^{d} \pm 0.97$	$5.39^{d} \pm 2.11$
1,000	$15.46^{c} \pm 0.25$	$18.23^{c} \pm 1.35$
2,000	$41.57^{b} \pm 2.40$	$40.17^{b} \pm 1.85$
4,000	$79.60^{a} \pm 2.34$	$76.93^{a} \pm 2.96$

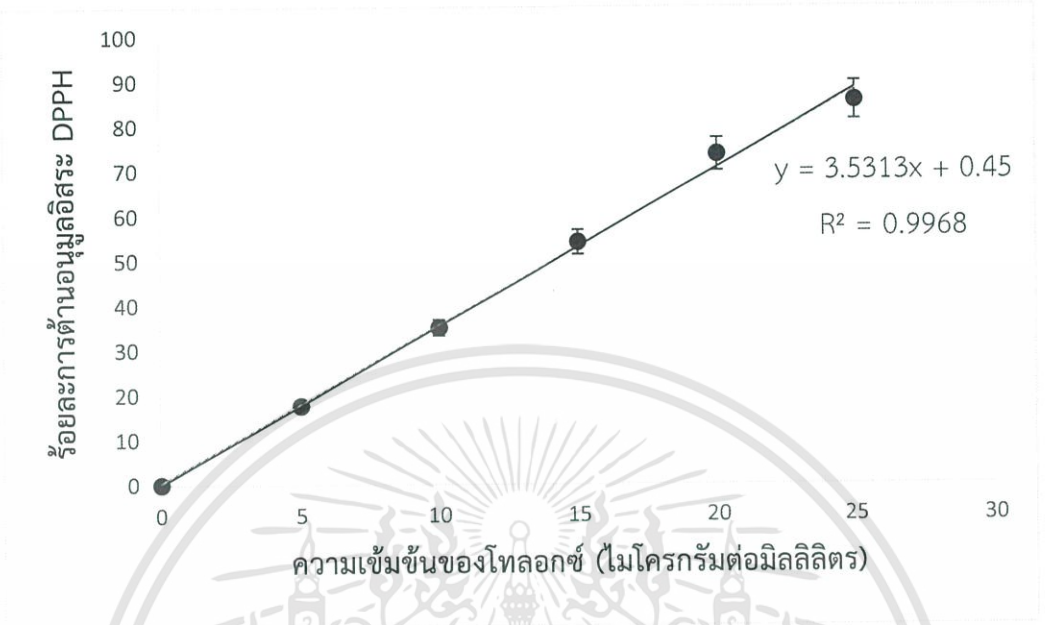
หมายเหตุ : ± SE = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

a-d แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata, M. chlamydospora* และ *M. hyalina* กับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณเพื่อหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9968 ทำให้ทราบถึงระดับความ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระให้ลดลง ร้อยละ 50 จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 มีค่าอยู่ที่ 14.014 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)
หมายเหตุ : (R^2) = ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Squared : Coefficient of Determination)

4.2.2 การทดสอบด้วยสารละลาย ABTS (ABTS scavenging activity)

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลายเอบีทีเอส ครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารจากเชื้อรา *Mortierella capitata, M. hyalina และ M. chlamydospora* โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลได้ออกมาเป็นสารสกัด 9 ชนิดที่ความเข้มข้นของสารสกัด 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดังตารางที่ 4.5 พบว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าร้อยละ 50 จากนั้นนำสารสกัดในชั้นเมทานอลของเชื้อรา 2 ไอโซเลตนี้มาเจือจางความเข้มข้นเป็น 2 เท่า ได้แก่ความเข้มข้น 2,000, 1,000 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดังตารางที่ 4.6 เพื่อหาค่า IC_{50} โดยสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* มีค่า IC_{50} จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 มีค่าเท่ากับ 1,885 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. hyalina* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,954 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ -2.07± 0.75, -2.45 ± 1.05, -3.48 ± 2.32 และสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากเชื้อรา *Mortierella capitata* และ *M. hyalina* ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS เฉลี่ย เมื่อวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่เรียกว่าค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) เท่ากับ 19.20± 1.45 และ 11.85± 1.46 มิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด

ตารางที่ 4.5 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*

ตัวทำละลาย	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด ± SE		
	M. capitata	*M. chlamydospora*	*M. hyalina*
Hexane	$-1.90^{e} \pm 0.75$	$-2.45^{e} \pm 1.05$	$-0.82^{de} \pm 0.75$
Ethyl acetate	$3.33^{cd} \pm 0.43$	$6.49^{c} \pm 2.94$	$0.56^{de} \pm 0.31$
Methanol	$65.69^{a} \pm 1.96$	$45.19^{b} \pm 0.48$	$64.49^{a} \pm 1.67$

หมายเหตุ : ± SE = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

a-e แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.6 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ในชั้นเมทานอล

ความเข้มข้น	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด ± SE	
	M. capitata	*M. hyalina*
500	$13.95^{d} \pm 2.06$	$6.13^{e} \pm 0.87$
1,000	$30.28^{c} \pm 0.94$	$16.85^{d} \pm 2.96$
2,000	$52.00^{b} \pm 2.67$	$31.02^{c} \pm 2.09$
4,000	$83.93^{a} \pm 2.48$	$77.85^{a} \pm 2.97$

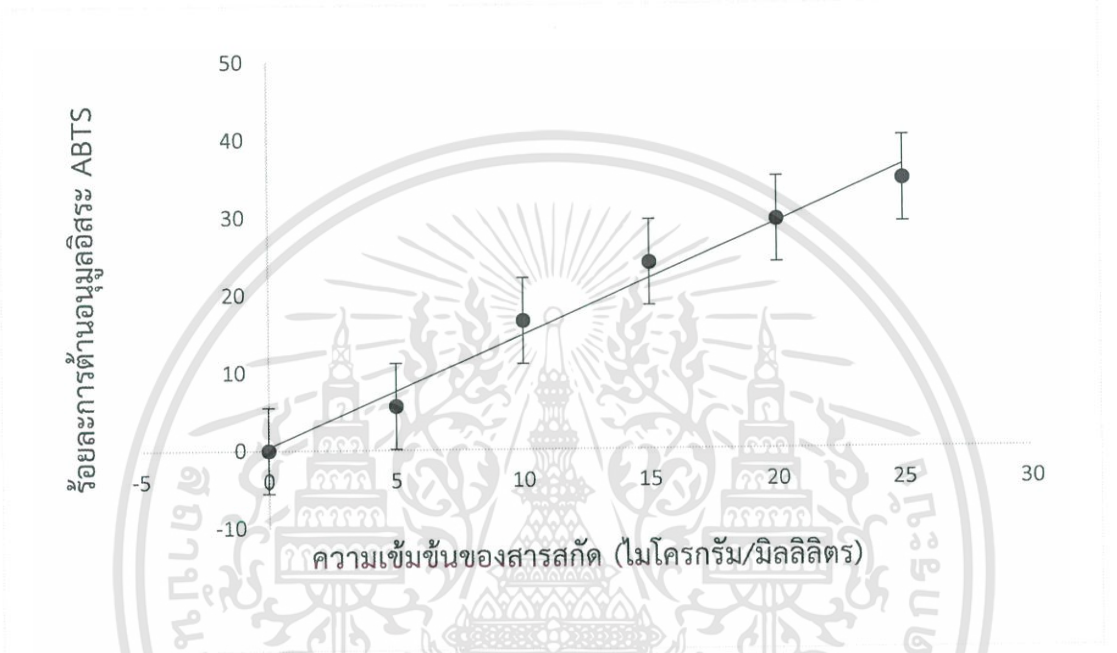
หมายเหตุ : ± SE = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard error of the mean)

a-e แสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่ได้จากเชื้อรา *Mortierella capitata, M. chlamydospora, M. hyalina* กับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำผลที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาคำนวณเพื่อหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ กับร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9968 ทำให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ สามารถต้านอนุมูลอิสระให้ลดลง ร้อยละ 50 จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 มีค่าอยู่ที่ 14.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.7



หมายเหตุ : (R^2) = ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Squared : Coefficient of Determination)

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)

สำหรับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (Free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำง่าย สะดวกและรวดเร็วเนื่องจาก DPPH และ ABTS ผลลัพธ์ที่ได้จากทั้งสองวิธีการเป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร และเมื่อเปรียบเทียบการทดสอบทั้ง 2 วิธีนี้จะเห็นว่าวิธี DPPH และ ABTS นั้นสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* สามารถกำจัดอนุมูลอิสระโดยให้ไฮโดรเจนอะตอมกับ DPPH และ ABTS ได้ดีกว่า *M. hyalina* ในทั้ง 2 การทดสอบ อาจเพราะในเชื้อรา *M. capitata* นั้นมีการผลิตสารประกอบฟีนอล ใหม่คือ N- (4,6-dihydroxy-2,3,5- trimethylbenzoyl) -glycine ที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าในเชื้อรา *M. hyalina* แต่ว่าอย่างไรก็ตามเมื่อเทียบผลในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยสารละลาย DPPH และสารละลาย ABTS ของเชื้อรา *Mortierella alpina* กับเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* พบว่าเชื้อรา *M. alpina* มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่สูงกว่าเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ของตัวอย่างดินที่ได้จากน้ำตกทีลอซู อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก สามารถคัดแยกเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมดจำนวน 2 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* อาจกล่าวได้ว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินรหัส TLS01-01 มีความน่าจะเป็นเชื้อรา *M. chlamydospora* และเชื้อราที่แยกได้จากดินรหัส TLS01-02 มีความน่าจะเป็นเชื้อรา *M. horticola* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน

จากผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินรหัสตัวอย่าง TLS01-02 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดในเชื้อราทั้งหมด โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 11.30±0.31 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน และพบว่าเชื้อรา *M. chlamydospora* มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำที่สุดในเชื้อราทั้งหมด โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 5.18±1.22 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน

จากผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* มีค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระเกินร้อยละ 50 คือ สารสกัดในชั้นเมทานอลของเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* และในการทดสอบด้วยสารละลาย DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,394 และ 2,522 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในการทดสอบด้วยสารละลาย ABTS มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1,885 และ 2,954 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายในชั้นเมทานอลที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. hyalina*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Mortierella* ทั้งนี้ควรนำเชื้อราที่แยกได้จากดินทั้ง 2 ไอโซเลต ไปบ่งชี้ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป เพื่อให้ทราบสายพันธุ์ที่ชัดเจน และจากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดของเชื้อรา *M. capitata, M. chlamydospora และ M. hyalina* ด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *Mortierella hyalina และ M. capitata* สามารถนำไปยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระได้ ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับสารสกัดอื่น ๆ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จัตุพล กันทะมูล, นพวัฒน์ เพ็งคำศรี, นิภาพร เมืองจันทร์, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น และสุภารัตน์ จันทร์เหลือง. 2554. "ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง." *วารสารไทยเภสัชศาสตร์ และวิทยาการสุขภาพ.* 6(3): 195-201.

ชุลี ชัยศรีสุข. 2546. **พันธุศาสตร์ของเชื้อรา.** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธัชชัย ตระกูลเลิศยศ. 2560. อนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Free radical and Antioxidant). [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://uatscimath.ipst.ac.th/article-biology/item/6903-2017-05-14-06-44-33.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2553. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. 2549. "ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพื้นบ้าน." ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. "อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Free Radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 21(3): 277-278.

ปวีนา ลิ้มเจริญ และสุชาดา มานอก. 2558. "การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร." *วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์.* 15(1): 106-117.

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2538. **ราวิทยาเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

วารียา ศรีสะอาด. 2553. "การผลิตกรดอะราคิโดนิกจากเส้นใย *Mortierella* sp." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2525. **ราวิทยาเบื้องต้น.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ : จามจุรีโปรดักท์.

สุภานัน สุขศิริ. 2561. "การคัดแยก และบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosatoya* และ *Talaromyces* เพื่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียน." ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สุรพันธ์ เทพาอมรเดช. 2546. "การจำแนก *Mortierella alpina* โดยลักษณะสัณฐานวิทยา และการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR." ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Chen, G. Diao, X. Lin, Q. Wang, T. Xu, J. Yang, X. and Zhou, J. 2018. "Phylogenetic Diversity and Antioxidant Activities of Culturable Fungal Endophytesassociated with the Mangrove Species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea." *Plos One.* 13(6): 1-18.

Ellis, D. 2016. *Mortierella wolfii*. [Online]. Avaliable : https://mycology.adelaide.-edu.au/descriptions/zygomycetes/mortierella/.

Dil, R. Y. Sang, W. K. Mahesh, A. Yong, H. U. Hyun, S. K. Changmu, K. Hyang, B. L. and Youn, S. L. 2015. "Three New Records of *Mortierella* Species Isolated from Crop Field Soil in Korea" *Micobiology.* 43(3): 203-209

Gams, W. 1997. "A Key to the Species of *Mortierella*." *Persoonia.* 9(3): 381-391.

Grabaric, B. S. Ivekovic, D. Milardovic, S. 2006. "A Novel Amperometric Method for Antioxidant Activity Determination Using DPPH Free Radical" *Bioelectrochemistry.* 68 (2): 175-180.

Hameed, A. Hussain, S. A. Ijaz, M. U. Liu, Q. Song, Y. and Suleria, H. A. 2017. "Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*)." *Nutrients.* 9(10): 1-20.

Hirota, A. Hojo, H. and Morimitsu, Y. 2014. "New Antioxidative Indophenol-reducing Phenol Compounds Isolate from the *Mortierella* sp. *Fungus*." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 61(4): 647-650.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Lateff, A.A. Fisch, K.M. Jones, P.G. Holler, U. Konig, G.M. and Wright, A.D. 2002. "New Antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium* sp." Journal of Natural Products. 65(11): 1605-1611.

Melo, I.S. Parma, M.M. Pellizari, V.H. Queiroz, S.N. Rosa, L.H. Santos, S.N. and Silva, L.J. 2014. "Isolation and Biological Activities of an Endophytic *Mortierella alpine* Strain from the Antarctic Moss *Schistidium antarctici.*" *Extremophiles.* 18(1): 15-23.

Thuong, T. Nguyen, T. Park, S.W. Pangging, M. and Lee, H.B. 2018. "Molecular and Morphological Confirmation of Three Undescribed Species of *Mortierella* from Korea" *Micobiology.* 47(1): 31-3

Vadivelan, G. and Venkateswaran, G. 2014. "Production and Enhancement of Omega-3 Fatty Acid from *Mortierella alpina* CFR- GV15." *BioMed Research International.* 2014 : 1-9.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

สำหรับปริมาตร 400 มิลลิลิตร

- ชั่งอาหาร PDA สำเร็จรูป 15.6 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร PDA สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

สำหรับปริมาตร 400 มิลลิลิตร

- ชั่งอาหาร PDB สำเร็จรูป 9.6 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร PDB สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อราสกุล *Mortierella*

2.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ชั่งสาร DPPH 15.77 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 80 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

2.2 การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

2.2.1 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิตร

ชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 33.11 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 50 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากัน

2.2.2 การเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ชั่งสาร ABTS 180.12 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 50 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

2.3 การเตรียมสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิตร

ชั่งสารมาตรฐานโทรลอกซ์ 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร จะได้เป็นความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นลงให้มีค่าเท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เพื่อใช้เป็นสต็อกสาร และเจือจางความเข้มข้นจากสต็อกของสารที่เตรียมไว้ให้มีค่าความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงข้อมูลดิบ

ตารางภาคผนวก ค.1 ตารางแสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella hyalina* (CHP33-S06)

อาหาร: PDA อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

CHP33-S06 (จำนวนซ้ำ)	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)
1	15.82	13.31	24.93	24.54	35.09	33.11	41.54	41.13	48.95	47.53
2	12.24	12.01	21.82	18.56	31.04	28.39	39.39	33.61	46.77	41.83
3	13.40	11.85	22.12	21.13	31.80	30.05	38.52	37.88	47.10	47.04
4	12.33	11.48	21.41	19.76	29.86	28.71	36.71	34.64	45.82	44.25
5	12.73	11.73	21.89	20.47	30.47	29.30	37.98	37.29	46.45	44.70
ค่าเฉลี่ย	13.30	12.08	22.43	20.89	31.65	29.91	38.83	36.91	47.02	45.07

ได้ค่าอัตราการเจริญ= 6.62 มิลลิเมตรต่อ 1 วัน

จากตารางภาคผนวก ค ที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *M. hyalina* (CHP33-S06) พบว่าระยะการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 6.62 มิลลิเมตรในระยะเวลา 1 วัน และเจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ตารางภาคผนวก ค.2 ตารางแสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella chlamydospora* (CHP28-S05)

อาหาร: PDA อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

CHP28-S05 (จำนวนซ้ำ)	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)
1	11.00	10.32	18.28	17.27	25.13	21.56	32.47	29.29	39.37	37.42
2	12.43	10.65	19.68	18.78	28.32	25.95	35.27	33.71	43.40	41.03
3	11.90	11.32	19.32	17.93	28.59	25.86	34.15	31.83	40.22	39.75
4	11.87	11.85	20.06	18.37	27.17	26.45	34.09	33.38	42.17	37.53
ค่าเฉลี่ย	11.80	11.04	19.34	18.09	27.30	24.96	33.99	32.05	41.29	38.93

ได้ค่าอัตราการเจริญ= 5.74 มิลลิเมตรต่อ 1 วัน

จากตารางภาคผนวก ค ที่ 2 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *M. chlamydospora* (CHP28-S05) พบว่าระยะการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 5.74 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน และเจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ตารางภาคผนวก ค.3 ตารางแสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Mortierella capitata* (CHP06-S03)

อาหาร: PDA อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

CHP06-S03 (จำนวนซ้ำ)	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)
1	25.07	23.81	41.12	40.01	54.69	54.65	73.23	70.07	75.23	74.40
2	26.00	25.04	42.01	40.96	60.43	58.03	72.17	71.15	80.81	77.76
3	25.48	24.09	40.09	38.91	58.03	56.24	72.82	71.15	74.69	72.85
4	25.39	24.61	44.32	42.35	61.46	59.63	72.24	71.02	80.04	78.28
ค่าเฉลี่ย	25.49	24.39	41.89	40.56	59.97	57.14	72.62	70.85	77.70	75.82

ได้ค่า อัตราการเจริญ= 10.36 มิลลิเมตรต่อ 1 วัน

จากตารางภาคผนวก ค ที่ 3 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *M. capitata* (CHP06-S03) พบว่าระยะการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 10.36 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน และจะเจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ตารางภาคผนวก ค.4 ตารางแสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-01

อาหาร: PDA อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

TLS01-01 (จำนวนซ้ำ)	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)
1	18.20	21.80	24.43	22.58	33.13	26.77	42.27	29.72	45.87	32.07
2	13.74	22.65	28.70	26.36	34.83	33.57	45.74	45.39	52.81	50.01
3	24.12	18.35	39.48	31.59	46.56	50.55	59.41	62.31	65.77	70.56
4	15.05	20.15	29.89	32.71	36.68	39.85	49.52	50.76	55.63	57.19
5	19.84	20.06	33.08	27.32	44.72	38.31	54.05	48.22	60.83	55.24
ค่าเฉลี่ย	18.19	20.60	31.12	28.11	39.18	37.81	50.20	47.28	56.18	53.01

ได้ค่า อัตราการเจริญ= 7.04 มิลลิเมตรต่อ 1 วัน

จากตารางภาคผนวก ค ที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-01 พบว่าระยะการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 7.04 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน และเจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ตารางภาคผนวก ค.5 ตารางแสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS01-02

อาหาร: PDA อุณหภูมิ: 25 องศาเซลเซียส

TlS01-02 (จำนวนซ้ำ)	วันที่ 1		วันที่ 2		วันที่ 3		วันที่ 4		วันที่ 5	
	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)
1	23.34	25.04	37.66	35.01	54.39	50.48	69.00	66.51	79.70	75.55
2	16.97	17.90	34.79	34.39	50.43	53.66	66.18	69.97	80.17	80.38
3	24.36	26.19	36.92	40.27	54.07	52.92	69.38	68.14	71.86	75.91
4	24.40	19.54	39.85	39.61	56.15	56.85	72.37	70.58	75.75	74.73
5	18.67	14.88	39.99	39.66	55.75	52.95	71.04	71.35	79.94	82.06
ค่าเฉลี่ย	21.55	20.71	37.84	37.79	54.16	53.37	69.59	69.31	77.48	77.73

ได้ค่า อัตราการเจริญ= 11.30 มิลลิเมตรต่อ 1 วัน

จากตารางภาคผนวก ค ที่ 5 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Mortierella* รหัสตัวอย่าง TLS02-02 พบว่าระยะการเจริญเติบโตเฉลี่ยเท่ากับ 11.30 มิลลิเมตร ในระยะเวลา 1 วัน และเจริญจนเต็มจานเพาะเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน

ตารางแสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella*

ตารางภาคผนวก ค.6 แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่สกัดจากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

เชื้อรา	ตัวทำละลาย	1	2	3	$\bar{X}$	SE
M. capitata	Hexane	-3.1746	-2.5178	-3.0104	-2.9009	0.3418
	Ethyl acetate	-1.4231	2.6820	-0.2737	0.3284	2.1177
	Methanol	70.4433	71.4286	72.9064	71.5928	1.23971
M. chlamydospora	Hexane	-2.2441	2.6820	3.0104	1.1494	2.9435
	Ethyl acetate	-0.0547	-0.7115	-6.6229	-2.4631	3.6175
	Methanol	51.3957	52.3810	59.1133	54.2967	4.2003
M. hyalina	Hexane	-5.1998	-6.5134	-3.5574	-5.0903	1.4808
	Ethyl acetate	-0.5474	-2.6819	0.7663	-0.8210	1.740
	Methanol	59.8249	60.8101	56.8692	59.1680	2.0509

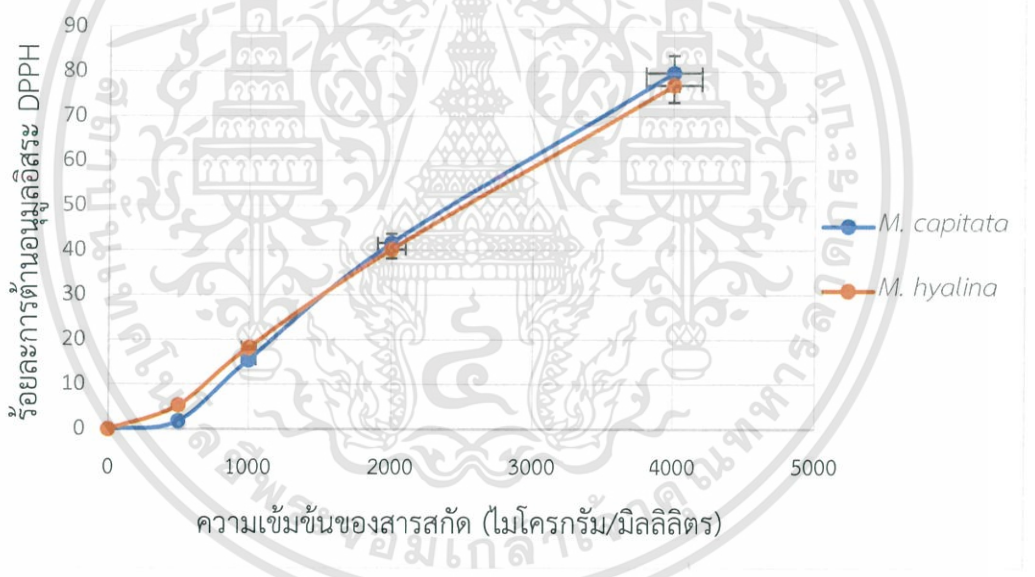
ตารางภาคผนวก ค.7 แสดงผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M. capitata* ในชั้นเมทานอล

M. capitata	จำนวนซ้ำ			$\bar{X}$	SE
ความเข้มข้น	1	2	3		
500	1.3384	2.9637	1.2428	1.8483	0.9671
1000	15.5513	15.1689	15.6469	15.4557	0.2529
2000	39.3244	43.0529	43.8177	41.5711	2.4040
4000	77.2785	79.5730	81.9630	79.6048	2.3424

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

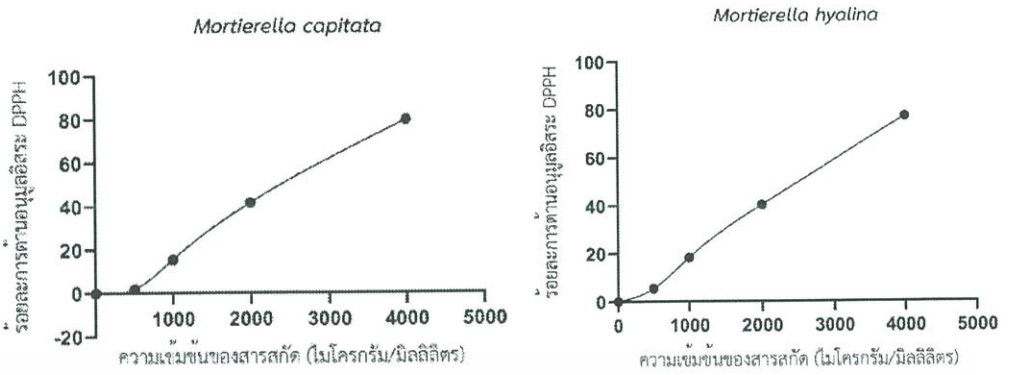
ตารางภาคผนวก ค.8 แสดงผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *Mortierella hyalina* ในชั้นเมทานอล

M. hyalina	จำนวนซ้ำ			$\bar{X}$	SE
ความเข้มข้น	1	2	3		
500	3.3779	7.3932	4.2384	5.3856	2.1141
1000	16.9853	18.0370	19.6622	18.2282	1.3486
2000	38.5915	41.7463	41.8419	40.1689	1.8497
4000	73.8368	76.9917	79.9554	76.9280	2.9598



รูปภาคผนวก ค.1 กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina* ในชั้นเมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ค.2 แสดงค่า IC_{50} จากสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *Mortierella capitata* และ *M. hyalina* ที่ทดสอบกับสารละลาย DPPH โดยวิเคราะห์ค่า IC_{50} จากการใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระให้ลดลงร้อยละ 50 อยู่ที่ 2,394 และ 2,522 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวก ค.9 ผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

Trolox ความเข้มข้น	1	2	3	$\bar{X}$	SE
5	17.3045	17.3373	18.1551	17.5990	0.4818
10	34.4782	34.1838	36.4082	35.0234	1.2082
15	54.3016	55.8391	51.8809	54.0072	1.9954
20	76.2512	70.8211	73.4707	73.5143	2.7153
25	83.1861	86.4573	86.7844	85.4760	1.9897

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ค.10 แสดงผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่สกัดจากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

สกุลเชื้อรา	ตัวทำละลาย	1	2	3	$\bar{X}$	SE
M. capitata	Hexane	-2.7732	-1.4682	-1.4688	-1.9032	0.7535
	Ethyl acetate	3.4258	3.5889	2.7732	3.32626	0.4316
	Methanol	67.6998	65.5791	63.7847	65.6879	1.9600
M. chlamydospora	Hexane	-2.8820	-1.2507	-3.2083	-2.4470	1.0489
	Ethyl acetate	4.3594	5.2746	9.8423	6.4921	2.9372
	Methanol	45.6770	45.1876	44.6982	45.1876	0.4894
M. hyalina	Hexane	-0.6525	-1.2507	-0.1631	-0.8157	0.7476
	Ethyl acetate	0.5981	0.5437	0.5438	0.5619	0.3137
	Methanol	63.7847	66.3948	63.2953	64.4916	1.6663

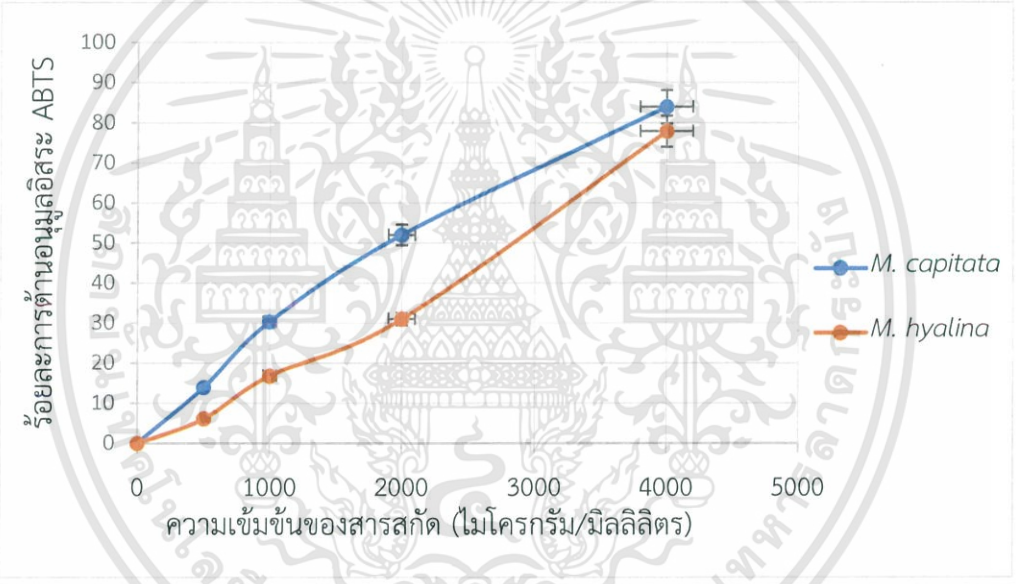
ตารางภาคผนวก ค.11 แสดงผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *M. capitata* ในชั้นเมทานอล

M. capitata	จำนวนซ้ำ			$\bar{X}$	SE
ความเข้มข้น	1	2	3		
500	11.9416	16.0653	13.8316	13.9462	2.0642
1000	30.9278	30.7131	29.2096	30.2835	0.9362
2000	51.2027	49.8282	54.9828	52.0046	2.6692
4000	81.856	84.6220	85.9966	83.9347	2.4780

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

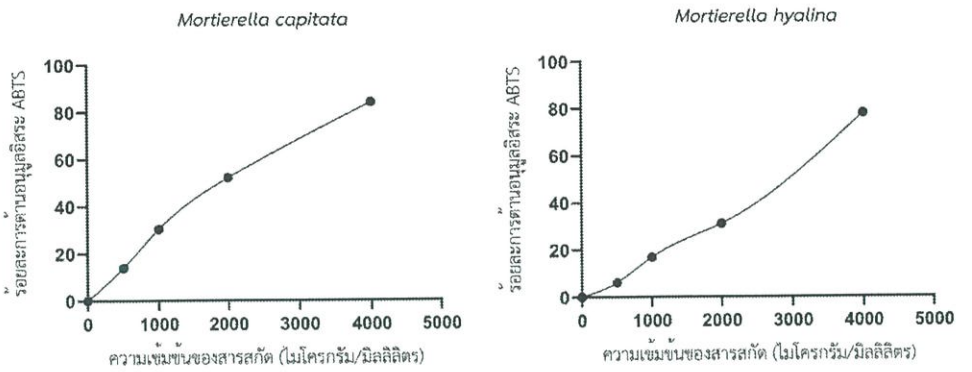
ตารางภาคผนวก ค.12 ผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,000 และ 4,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ของเชื้อรา *Mortierella hyalina*

M. hyalina	จำนวนซ้ำ			$\bar{X}$	SE
ความเข้มข้น	1	2	3		
500	5.1411	6.7727	6.4883	6.1340	0.8716
1000	15.7810	14.3511	20.4054	16.8459	2.9645
2000	31.9447	34.2379	33.6660	31.0211	2.0852
4000	83.1279	77.3133	73.1184	77.8532	2.9662



รูปภาคผนวก ค.3 กราฟแสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ต่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเชื้อรา *M. capitata* และ *M. hyalina*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวก ค.4 แสดงค่าร้อยละ IC_{50} จากสารสกัดเชื้อรา *Mortierella capitata* และ *M. hyalina* ที่ทดสอบกับ ABTS โดยวิเคราะห์จากการใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระให้ลดลงร้อยละ 50 อยู่ที่ 1,885 และ 2,954 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางภาคผนวก ค.13 แสดงผลร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

Trolox ความเข้มข้น	1	2	3	$\bar{X}$	SE
5	5.9175	4.1802	6.8947	5.6641	1.37484
10	15.4180	15.7438	18.5125	16.5581	1.70038
15	25.0271	22.5299	24.3757	23.9776	1.29537
20	28.3388	28.6645	31.4332	29.4788	1.70038
25	34.9077	35.3963	33.2790	34.5277	1.10861

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้