

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอล
และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดหัวลิงและเห็ดคิมิลค์กี้

STUDY ON BIOACTIVITY OF CRUDE METHANOL AND
CRUDE POLYSACCHARIDE FROM *Hericium erinaceus*
AND *Calocybe indica*

นฤกร หอมเปาะ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอล
และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้

STUDY ON BIOACTIVITY OF CRUDE METHANOL AND
CRUDE POLYSACCHARIDE FROM *Hericium erinaceus*
AND *Calocybe indica*

นฤพร หอมเปาะ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

STUDY ON BIOACTIVITY OF CRUDE METHANOL AND
CRUDE POLYSACCHARIDE FROM *Hericium erinaceus*
AND *Calocybe indica*

NARUPHORN HOMPOA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

หัวข้อโครงการพิเศษ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลและ
โพลีแซคคาไรด์จากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี

Study on bioactivity of crude methanol and crude
polysaccharide from *Hericium erinaceus* and *Calocybe indica*

ชื่อนักศึกษา นฤกร หอมเปาะ

รหัสนักศึกษา 56050848




ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.วิมลมาศ บุญมี กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลและโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนฤกร หอมเปาะ รหัสนักศึกษา 56050848
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ ที่สกัดด้วยเมทานอล และโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำและต่าง ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าค่า 50% inhibition concentration (IC_{50}) ของสารสกัดจากเมทานอล และโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำและต่างจากเห็ดหัวลิงมีค่าเท่ากับ 2.71, 4.94 และ 6.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเมทานอล และโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำและต่างจากเห็ดมิลค์กี้มีค่าเท่ากับ 4.35, 6.10 และ 4.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากเห็ดมิลค์กี้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง มีค่าเท่ากับ 6.63 และ 6.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดเมทานอล และสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ในอนาคต

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เห็ดมิลค์กี้ เห็ดหัวลิง

Title	Study on bioactivity of crude methanol and crude polysaccharide from <i>Hericium erinaceus</i> and <i>Calocybe indica</i>
Student	Miss. Naruphorn Hompoa Student ID 56050848
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic year	2015
Advisor	Asst.Prof.Dr.Supattra Poeaim.

Abstract

This research was studied the antioxidant and anti-tyrosinase activity of crude methanolic and crude polysaccharides from alkaline and water extraction of *Hericium erinaceus* and *Calocybe indica*. The results of ABTS assay showed that 50% inhibition concentration (IC_{50}) antioxidant capacity of *H. erinaceus* by crude methanol extract and crude polysaccharide with alkaline and water extract were 2.71, 4.94 and 6.17 mg/ml, respectively. 50% inhibition concentration of *C. indica* by crude methanol extract and crude polysaccharide with alkaline and water extract were 4.35, 6.10 and 4.39mg/ml, respectively. For anti-tyrosinase capacity, the results showed that IC_{50} anti-tyrosinase capacity of the crude methanol of *C. indica* and the crude polysaccharide with alkaline of *C. indica* and *H. erinaceus* were 7.28, 6.63 and 6.01 mg/ml, respectively. These results suggest that the polysaccharide extracts from *H. erinaceus* and *C. indica* have a potential to be used as ingredients in cosmetic products in the future.

Keyword : Antioxidant, Anti-tyrosinase, *Calocybe indica*, *Hericium erinaceus*

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้ความกรุณา ความช่วยเหลือ แนะนำ สนับสนุน และเป็นกำลังใจในโครงการพิเศษนี้ และช่วยแก้ไข ตรวจสอบ รายงานโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ดร. วิมลมาศ บุญมี ประธานกรรมการและ กรรมการที่ช่วยเหลือและแนะนำในโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่คอยดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือในการปฏิบัติทดลอง ต่าง ๆ เพื่อให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์และ สารเคมีต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจให้ ตั้งแต่เริ่มการศึกษาจนจบ การศึกษา

และสุดท้ายขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่เกี่ยวข้อง ช่วยเหลือซึ่งกันและกันมาโดยตลอด ในการ ทำโครงการพิเศษ

นฤกร ทอมเปาะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เห็ดหัวลิง.....	3
2.2 เห็ดมิลค์กี้.....	4
2.3 อนุมูลอิสระ.....	5
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	7
2.5 เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	9
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	11
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี.....	11
3.2 การเตรียมตัวอย่างและกระบวนการสกัด.....	14
3.3 การสกัดโพลีแซคคาไรด์.....	15
3.3.1 การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำ.....	15
3.3.2 การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่าง.....	15
3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS.....	15
3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย.....	13
4.1 ผลการสกัดสาร.....	13
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	19
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	26
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	26
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	26
เอกสารอ้างอิง.....	27
ภาคผนวก.....	30
ภาคผนวก ก.....	31

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ตารางแสดงชุดทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	17
4.1 ตารางแสดงค่าผลได้ของสารสกัดแต่ละชั้นจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้.....	18
4.2 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากสารสกัดในเห็ดหัวลิงและเห็ด นมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	20
4.3 ค่า IC ₅₀ ของของสารสกัดต่าง ๆ ในเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้.....	21
4.4 แสดงค่าปริมาณโทรล็อกซ์ต่อปริมาณสารสกัด (µg TEAC/mg extract).....	22
4.5 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากเห็ดหัวลิง สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วย ต่างของเห็ดมิลค์กี้ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	23
4.6 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของ เห็ดหัวลิง และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้.....	24
4.7 ค่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่อปริมาณสารสกัด.....	25

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	เห็นหัวลิงเทียบขนาดกับเหรียญสิบบาทและไม้บรรทัด..... 4
2.2	ลักษณะเห็นมิลค์กี้..... 5
2.3	ปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS..... 9
2.5	กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน..... 10
4.1	ลักษณะของสารสกัดต่าง ๆ จากเห็นหัวลิงและเห็นมิลค์กี้..... 19
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ ความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ..... 20
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของ โทรลิกซ์ ($\mu\text{g/ml}$)..... 21
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดต่าง ๆ..... 23
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและความเข้มข้น ของกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$)..... 24

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
AAE	Ascorbic acid equivalent
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
DW	Dried weight
g	Gram
IC ₅₀	50% inhibition concentration
KAE	Kojic acid equivalent
mg	Milligram
mmol	Millimol
ml	Milliliter
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TE	Trolox equivalent
μg	Microgram
μl	Microliter

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมนุษย์ต้องเผชิญกับมลภาวะต่าง ๆ ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระนั้นทำให้ไม่มีความคงตัว และเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดความเสื่อมของอวัยวะ เช่น ทำให้ผิวแห้งกร้านสะสม เหี่ยวยุบ มีเม็ดสีผิดปกติ โดยเฉพาะปัจจัยที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระบนผิวที่หลีกเลี่ยงไม่ได้คือ แสงแดด จึงต้องมีสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระ และหยุดปฏิกิริยาทำลายเซลล์ โดยร่างกายสามารถรับสารต้านอนุมูลอิสระได้จากการบริโภคอาหารที่มีวิตามินซีหรือเบต้า-แคโรทีน ซึ่งการบริโภคเห็ดจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ดังนั้นการเลือกบริโภคอาหารที่มีประโยชน์จึงต้องคำนึงถึงคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณพลังงานที่ได้รับจากการรับประทานอาหาร และสะดวกต่อการบริโภค เมื่อบริโภคเข้าไปแล้วจะทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันและสุขภาพที่ดี และการบริโภคเห็ดในปัจจุบันก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทั้งในด้านการค้าและด้านสุขภาพ ซึ่งจะเห็นได้จากตามห้างสรรพสินค้า ตลาด หรือแม้กระทั่งในอินเทอร์เน็ต และสามารถพบได้ในรูปแบบของเห็ดสด เห็ดแปรรูป เห็ดสกัด หรือเห็ดทอด โดยเห็ดเป็นตัวอย่างของอาหารที่มีประโยชน์ทั้งในทางโภชนาการและยังเป็นอาหารเป็นยา เห็ดถูกค้นพบและใช้ประโยชน์มานานนับพันปี คุณค่าทางโภชนาการเห็ดมีพลังงานน้อยมากและมีปริมาณน้ำสูงถึงร้อยละ 80-90 มีเส้นใยอาหารสูง โปรตีนสูง คาร์โบไฮเดรตต่ำและไขมันต่ำมาก ตัวอย่างเช่น เห็ดหอม มีไขมัน 0.49 กรัม ต่อ 100 กรัมสด นอกจากนี้ ยังมีโซเดียมต่ำด้วย (USDA, 2011) นอกจากนี้เห็ดหอมแล้วยังมีเห็ดไมตาเกะ เห็ดหลินจือ เห็ดยามาบูชิทาเกะ เห็ดนางรม เป็นต้น เห็ดเหล่านี้ถูกเรียกว่า “เห็ดทางการแพทย์ (Medicinal Mushrooms)” (Ana และคณะ, 2008; Meletis and Baker, 2005)

เห็ดยามาบูชิทาเกะ (*Hericium erinaceus*) หรือที่รู้จักกันในชื่อเห็ดปูยฝ้ายหรือเห็ดหัวลิง ได้รับการขนานนามว่า “Mountain Hidden Mushroom” เพราะเป็นเห็ดที่หาได้ยากในธรรมชาติ พบว่าเห็ดยามาบูชิทาเกะเป็นแหล่งของโปรตีนมีกรดอะมิโนอยู่ถึง 16 ชนิด ส่วนฤทธิ์ทางยานั้น แพทย์แผนตะวันออกใช้เห็ดยามาบูชิทาเกะในการเพิ่มกำลังวังชา บำรุงกระเพาะอาหารและม้าม นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง กระเพาะอาหาร หลอดอาหาร อีกด้วย (Wang และคณะ, 2014)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้
- 2) เพื่อศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) ตัวอย่างเห็ดหัวลิงสดจากมารยาทฟาร์ม จังหวัดปทุมธานี และเห็ดมิลค์กี้
- 2) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบเมทานอลและโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำและต่างจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้
- 3) ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome ของสารสกัดหยาบเมทานอลและโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำและต่างจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดเมทานอลและสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ ในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดหัวลิง

เห็ดหัวลิง ดอกเห็ดมีรูปร่างเป็นก้อนวงรี เกือบกลม สีขาว ถ้าแก่มากจะมีสีน้ำตาลอ่อน ในขณะที่ดอกเห็ดอ่อน ยังไม่แตกเป็นขนจะมีลักษณะคล้ายจำวมะพร้าว ถ้าเริ่มแก่จะแตกเป็นฝอยคล้ายหัวลิง จึงเป็นที่มาของชื่อเห็ดหัวลิง ดังรูปที่ 2.1 มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hericium erinaceus* นอกจากนี้ยังมีชื่ออื่นๆอีก เช่น เห็ดปุยฝ้าย, เห็ดภูมามาลา, เห็ดแผงสิงโต, เห็ดหิมะ ชาวต่างชาติจะเรียกว่า Monkey's Head, Lion mane, Bear Head, old man's Beard, Hedgehog mushroom, Satyr's Beard, Pom Pom ภาษาญี่ปุ่นเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า Yamabushitake และภาษาจีนเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เก่าเถ่าโกว ต้นกำเนิดของเห็ดชนิดนี้อยู่ที่เขตเฮอหลงเจียง ประเทศจีน และนายฮังจง แซ่หลู ชาวเกษตรจีนนำมาเพาะครั้งแรกที่ดอยแม่สลอง จังหวัดเชียงราย หลังจากนั้นได้มีผู้เพาะเห็ดชนิดนี้อีกหลายราย ศูนย์เห็ดล้านนาได้มีการเพาะเห็ดหัวลิงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดเชียงใหม่ (ลุงลี, 2013) เป็นเห็ดที่หาได้ยากในธรรมชาติ จึงได้รับการขนานนามว่า “Mountain Hidden Mushroom” มีกลิ่นที่แรงคล้ายเนื้อสัตว์ เนื่องจากในเห็ดหัวลิงนั้นมีกรดอะมิโนถึง 16 ชนิด ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถึง 7 ชนิด มีโปรตีนสูงและมีวิตามินหลายชนิด จึงทำให้เห็ดหัวลิงได้รับฉายาว่า “เนื้อสัตว์จากพืช”

ลำดับอนุกรมวิธานของเห็ดหัวลิง

Kingdom : Fungi

Division : Basidiomycota

Subdivision : Agaricomycotina

Class : Agaricomycetes

Order : Russulales

Family : Hericiaceas

Genus : *Hericium*

Species : *H. erinaceus*



รูปที่ 2.1 เห็ดหัวลิงเมื่อเทียบกับเหรียญสิบบาทและไม้บรรทัด

ที่มา : นฤกร หอมเปาะ

จากข้อมูลพบว่าแพทย์แผนโบราณใช้เห็ดยามาบุชิตาเกะปรุงยาสมุนไพร นอกจากนี้ยังมียานวิจัยทางการแพทย์พบว่าในเห็ดยามาบุชิตาเกะมีสารสำคัญช่วยเร่งการสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ (T-Lymphocyte) และมาโครฟาจซึ่งมีผลต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกัน กำจัดเชื้อโรค ไวรัส และแบคทีเรียในร่างกาย และยังมีการใช้ในการดูแลสุขภาพด้านอื่นๆ เช่น ช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องหลอดเลือดและหัวใจ เป็นต้น (Khan และคณะ, 2013)

Luo และ Chen (2010) ได้กล่าวไว้ว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Heridium erinaceus* สามารถยับยั้งการสูญเสียองค์ประกอบโลหะภายในกะโหลกศีรษะได้

2.2 เห็ดมิลค์กี้

เห็ดมิลค์กี้ (Milky mushroom) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Calocybe indica* มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศอินเดีย ซึ่งเรียกว่า "Dhuth Chatta" ซึ่งหมายถึงเห็ดมิลค์กี้สีขาว ดังรูปที่ 2.2 (Krishnamoorthy และ Venkatesh, 2015.) ในธรรมชาติเห็ดมิลค์กี้จะพบได้ตามแปลงการเกษตรหรือตามริมถนนในเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อน โดยเฉพาะในเขตที่ราบที่ราบของรัฐทมิฬนาฑู (ทางตอนใต้ของประเทศอินเดีย) และในรัฐราชสถาน ซึ่งตั้งอยู่ทางตะวันตกของประเทศอินเดีย (Bokaria และคณะ, 2014) รายงานว่า *Calocybe indica* APK2 ให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิห้อง 24 – 27 องศาเซลเซียส และสามารถปลูกได้แม้กระทั่งไม่มีวัสดุที่ใช้ในการเพาะปลูก ข้อดีของการปลูกเห็ดชนิดนี้คือการลงทุนต่ำ ปลูกง่ายกว่าเห็ดชนิดอื่น มี Fruiting body ที่ยาว มีสีขาวน่าพึงพอใจ สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน มีคุณค่าทางโภชนาการ และใช้เวลาน้อยในการเจริญเติบโต โดยทั่วไปในการเพาะปลูกเห็ดมิลค์กี้นั้นต้องมีการใช้วัสดุดิบแบบดั้งเดิม ซึ่งเห็ดเป็นหนึ่งในแหล่งโปรตีนที่ถูกที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับมังสวิรัต จึงมีความจำเป็นในการเพาะปลูกมากขึ้น

ลำดับอนุกรมวิธานของเห็ดมิลค์กี้

Kingdom : Fungi

Division : Basidiomycota

Class : Agaricomycetes

Order : Agaricales

Family : Lyophyllaceae

Genus : *Calocybe*

Species : *C. indica*

Govindan และคณะ, (2015) ได้ทำการวิจัยเห็ดมิลค์กี้ *Calocybe indica* โดยใช้การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ที่ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่า DPPH radical scavenging activity (%) เท่ากับ 18.03% 25.02% 47.22% 61.43% และ 74.46% ตามลำดับ



รูปที่ 2.2 เห็ดมิลค์กี้ (Milky Mushroom)

ที่มา: <https://thumbs.dreamstime.com/z/milky-mushroom-selective-focus-over-white-background-32376783.jpg>

2.3 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่รอบิพัลวงนอกสุดและมีระดับพลังงานสูง รวมทั้งอะตอมของไฮโดรเจนและไอออนของโลหะทรานซิชัน ส่วนใหญ่การที่อนุมูลอิสระมีอิเล็กตรอนเดี่ยวทำให้เป็นสารที่ไม่เสถียร ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีคุณสมบัติ คือ ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ โดยอนุมูลอิสระจะเข้าไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่รอบข้าง ก่อให้เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากจะส่งผลต่อการทำลายระบบต่าง

ๆ ในร่างกายให้เสียสมดุลและส่งผลเสียต่อเซลล์ รวมทั้งเป็นสาเหตุของความชราและโรคต่าง ๆ เช่น โรคอัลไซเมอร์ ไชข้ออักเสบ หรือโรคมะเร็ง เป็นต้น (เรณู, 2559)

2.3.1 แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (Sources of free radical)

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจน เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัย ทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้

2.3.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึมซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

2.3.1.1.1 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (auto-oxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน

2.3.1.1.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell, 1999) การทำงานของเอ็นไซม์ สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ ภายในร่างกายได้แก่ เอ็นไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เป็นแซนทีน (xanthine) และแซนทีน เป็นกรดยูริก (uric acid) พร้อม ๆ กับเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) เอ็นไซม์ไลโปออกซีจีเนส (lipoxygenase: OX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอ็นไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมัน

2.3.1.1.3 กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) โดยการทำงานของเอ็นไซม์ NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว

2.3.1.1.4 โลหะทรานสิชัน (transition metal) (Halliwell, 1999) โลหะทรานสิชัน 2 ชนิดคือ เหล็ก (Fe^{2+}) และ ทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction)

2.3.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย

2.3.2.1 ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin), แอนทราไซคลินส์ (anthracyclines) และเมโทเทรีเสต (methotrexate) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

2.3.2.2 รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (Xray), รังสีแกมมา (γ -ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell, 1999)

2.3.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ ในคาร์บอนไดออกไซด์มีส่วนประกอบของ ไนตริกออกไซด์ (NO), ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และ เพอร์ออกซิไนไตรท์ (ONOO^-) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกลำเลียงออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอนไซม์ ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ภายในเซลล์ดังกล่าว

2.3.2.4 โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็น สารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สามารถป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลาย จึงใช้ป้องกันหรือชะลอความเหี่ยวย่นของผิวได้ โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบ ฟีนอลิก (Phenolic compounds) สารประกอบ ไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเรา จะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระอยู่แล้วซึ่งแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุลและส่วนที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ ซี อี หรือเบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นสารพิษทุกชนิดที่สามารถพบได้ในพืชผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลายอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมดจะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า “Oxidative stress” ขึ้น ภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่างได้

2.4.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากพืชผัก เครื่องเทศ ฝรั่ง และ สมุนไพร ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารสกัดจากธรรมชาติ สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

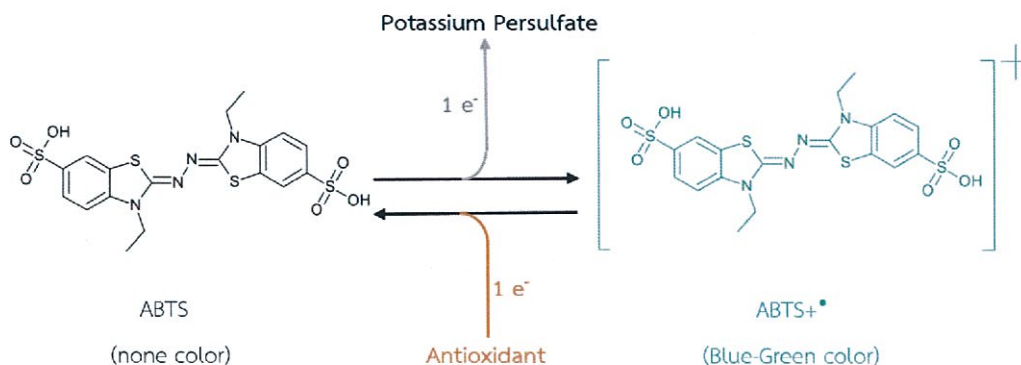
2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ propyl gallate, 2 - butylated hydroxyanisole, 3 - butylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxyanisole) และ tertiary butylhydroquinone เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ในทั้งจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชัน (function group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้น หรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล H^+ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล OH^{\cdot} ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลอิสระโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} แลพ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) (เจนจิรา และประสงค์, 2554) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งพบในพืชพรรณธรรมชาตินานาชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการ (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo)

2.4.2 วิธีการวิเคราะห์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant assay)

การฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\cdot+}$, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\cdot+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\cdot+}$ ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต จากนั้นนำ $ABTS^{\cdot+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.3 จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\cdot+}$ ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\cdot+}$ ไม่เป็นสาร

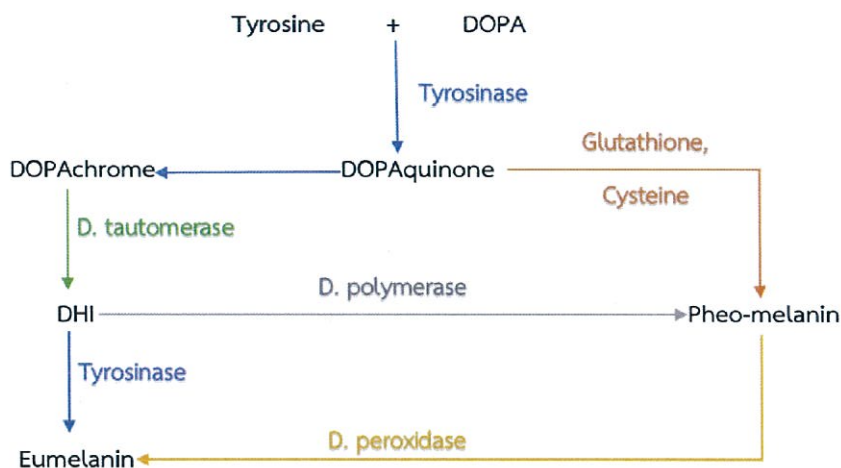
ธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (บุหรณ์, 2556)



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS
ดัดแปลงจาก Pannala และคณะ, 2011

2.5 เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) โดยทั่วไปเอนไซม์ไทโรซิเนสจะพบใน เนื้อเยื่อสัตว์และพืช ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough Endoplasmic Reticulum ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) ซึ่ง กระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของ กระบวนการ คือ เร่งปฏิกิริยาของ L-Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone ดังรูปที่ 2.4 นอกจากนี้ในกระบวนการสร้างเม็ดสียังมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการนี้ด้วย (นุรฮายานา และคณะ, 2555)



รูปที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน
ดัดแปลงจาก มูฮำหมัด และคณะ, 2559

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mirunalini และคณะ, (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ดมิลค์กี้ด้วยวิธี ABTS โดยการนำตัวอย่างเห็ดมิลค์กี้มาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปหมักด้วยเอทานอล นำมากรองและทำการหมักด้วยเอทานอลอีกครั้ง และนำไปประเหยเอาตัวทำละลายออก พบว่าที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 63% และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.2 ไมโครกรัมต่อลิตร

จากงานวิจัยของ Li และคณะ, (2012) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสกัดโพลีแซคคาไรด์ในเห็ดชนิดต่างๆ โดยใช้กรด ต่าง และน้ำในการสกัด ซึ่งเริ่มต้นนำตัวอย่างเห็ดไปกำจัดเอาไขมันออกด้วยหมักด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์เป็นเวลาข้ามคืน จึงนำตัวอย่างเห็ดมาทำการสกัดด้วยน้ำ กรดไฮโดรคลอริก (ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร) ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath เป็นเวลา 20 นาทีและให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมากรองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $8,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปประเหยเอาตัวทำละลายออก โดยตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำจะนำไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ส่วนกรดและด่างจะนำไปไดอะไลซิส (dialyze) และกลั่นลำดับส่วน พบว่าในเห็ดหัวลิงจากการสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยกรด ต่าง และน้ำนั้นมีการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 16.05 ± 0.19 , 31.66 ± 0.38 และ $1.70 \pm 0.42 \mu M TE/g$

Hsu และคณะ, (2013) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในเห็ดชนิดต่าง ๆ โดยใช้ความร้อนและน้ำเย็นในการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนจะทำโดยนำตัวอย่างเห็ดผง 1 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมากรองและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $4,000 \times$

g ส่วนการสกัดด้วยน้ำเย็นจะใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับการสกัดน้ำร้อน แต่จะใช้การเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแทนการให้ความร้อน พบว่าในเห็ดหัวลิงที่สกัดด้วยน้ำร้อน มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 10.9 ± 0.5 TEAC (mmol TE/g DW) และเห็ดหัวลิงที่สกัดด้วยน้ำเย็น มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 17.7 ± 1.5 TEAC (mmol TE/g DW)

จากงานวิจัยของ Han และคณะ, (2015) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากเห็ดหัวลิง โดยใช้เอทิลอะซิเตท เมทานอลและอะซิโตนในการสกัด ซึ่งเริ่มต้นนำผงเห็ด 50 กรัม เติมลงในเอทิลอะซิเตท เมทานอลและอะซิโตนที่มีปริมาตร 400 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมากรองและเขย่า 2 ชั่วโมง และระเหยตัวทำละลายออก พบว่าการสกัดโดยใช้เอทิลอะซิเตท, เมทานอลและอะซิโตนนั้นมีความต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากับ $88.5\% \pm 0.71$, $92.8\% \pm 2.13$ และ $89.4\% \pm 0.27$ เมื่อใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ

จากงานวิจัยของ Chih และคณะ, (2008) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากไมซีเลียมของเห็ด ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Potato dextrose broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 7 วัน นำมากรองจนได้ส่วนของไมซีเลียม นำส่วนของไมซีเลียมมาสกัดด้วยเอทานอล 75%, เอทานอล 50% และน้ำ โดยหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน และนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออก ซึ่งใช้เห็ด 4 ชนิดได้แก่ เห็ดหลินจือแดง (*Ganoderma lucidum*), เห็ดจางจือ (*Antrodia camphorate*), เห็ดกระดุมบลาซิล (*Agaricus brasiliensis*) และเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) โดยใช้ เอทานอล 75%, เอทานอล 50% และน้ำกลั่นในการสกัด พบว่าในเห็ดหลินจือแดงมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสประมาณ 80% ($IC_{50} = 0.32$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการสกัดทั้งหมด ส่วนเห็ดจางจือมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50% จากการสกัดด้วยเอทานอล 75% ($IC_{50} = 1$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในเห็ดกระดุมบลาซิลและเห็ดถั่งเช่าสีทองมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยกว่า 25% ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้น 350 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยของ Ki และคณะ, (2011) ได้มีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ดหอม (*Lentinus lepideus*) ด้วยอะซิโตน เมทานอล และน้ำร้อนในการสกัด เริ่มต้นนำเห็ดหอมไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบ่มด้วยอะซิโตน 60% และเมทานอล 80% ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออก ส่วนการสกัดด้วยน้ำ จะนำตัวอย่างมาเติมลงในน้ำกลั่นและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมากรองและระเหยเอาตัวทำละลายออก ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นที่ 0.125 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดจากเห็ดหอมให้ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการสกัดด้วยอะซิโตน เมทานอล และน้ำร้อน อยู่ในช่วง 9.71-58.84%, 11.23 - 56.22% และ 6.97 - 51.52% โดยใช้กรดแอสคอร์บิกและกรดโคจิกเป็นสาร

มาตรฐาน และใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสรุปได้ว่าการสกัดด้วยอะซิโตนและเมทานอลได้ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ในช่วงที่ดี

Ki และคณะ, (2015) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ไมซีเลียมจากเห็ดโดยเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Potato dextrose broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมากรองจนได้ส่วนของไมซีเลียม นำส่วนของไมซีเลียมมาสกัดด้วยเอทานอล 40% หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน และนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออก ซึ่งจะใช้เห็ด *Inonotus mikadoi*, เห็ดหลินจือ (*Coriolus versicolor*), เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*), เห็ดนางรม (*Panellus serotinus*), เห็ดหูหนูดำ (*Auricularia auricula*) และ เห็ดขอน (*Fomitopsis* sp.) พบว่ามีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ $46.0\% \pm 7.5$, $26.3\% \pm 8.3$, $18.8\% \pm 2.5$, $6.3\% \pm 3.2$, $9.4\% \pm 0.0$ และ $23.9\% \pm 2.5$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ที่ 1,700 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้อัลบูมินและวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน

จากงานวิจัยของ Kaewnarin และคณะ, (2016) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด 4 ชนิดได้แก่ *Rugiboletus extremiorientalis*, *Russula emetica*, *Russula* sp. และ *Phlebopus portentosus*. โดยใช้เอทานอล 95% เมทานอล 95% กรดไฮโดรคลอริก 1% และน้ำในการสกัดสาร ซึ่งเริ่มต้นนำเห็ดผง 5 กรัม นำไปเติมลงในเอทานอล 95% เมทานอล 95% กรดไฮโดรคลอริก 1% และน้ำ นำไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมากรองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส 1,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าจากการสกัดด้วยเมทานอลในเห็ด *R. extremiorientalis* มีค่าเท่ากับ 0.17 mg KAE/g DW *R. emetica* มีค่าเท่ากับ 0.066 mg KAE/g DW และ *P. portentosus* มีค่าเท่ากับ 0.056 mg KAE/g DW เมื่อเทียบกับกรดโคจิกเป็นสารมาตรฐาน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) บริษัท Scientific industries รุ่น G-560E
- 2) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Shimadzu รุ่น A1080
- 3) เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary Evaporator) บริษัท Heidolph
- 4) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler Toledo รุ่น ML303/01
- 5) เครื่อง Ultrasonic cleaner บริษัท Crest
- 6) เครื่องปั่น บริษัท TEFAL
- 7) หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
- 8) เครื่องดูดจ่ายสารแบบอัตโนมัติ (Autopipette) บริษัท BIOHIT
- 9) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Z383K
- 10) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท กล้วยน้ำไทย เตอาอบ
- 11) ตู้ดูดควัน (Hood) บริษัท Sartorius
- 12) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 13) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครโพลีเทอไรต์เพลท (Microplate Reader)
- 14) กล้องจุลทรรศน์
- 15) 96 well plate
- 16) กรวยบุชเนอร์ (Buchner funnel)
- 17) ขวดลดความดัน (Suction flask)
- 18) โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 19) ปิเปตทิป (Pipette tip)
- 20) หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Micro centrifuge tube)

- 21) หลอดทดลอง (Test tube)
- 22) ขวดดูแรน ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1,000 มิลลิลิตร (Laboratory bottle)
- 23) ถาดอะลูมิเนียม
- 24) กระดาษฟรอยด์
- 25) ผ้าขาวบาง
- 26) กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 70 มิลลิเมตร

สารเคมี

- 1) เมทานอล (Methanol)
- 2) เอทานอล (Ethanol) 95%
- 3) เอทานอล (Ethanol) 70%
- 4) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 5) 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)
- 6) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid (trolox)
- 7) น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ
- 8) Parafilm
- 9) เอนไซม์ไทโรซิเนส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร
- 10) ฟอสเฟสบัฟเฟอร์
- 11) L-Dopa 2.5 mM

3.2 การเตรียมตัวอย่างและกระบวนการสกัด

ทำการชั่งน้ำหนักเห็ดหัวลิงสดและเห็ดมิลค์กี้ จากนั้นนำเห็ดหัวลิงสดและเห็ดมิลค์กี้มาทำการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้งหลังจากการอบแห้ง หลังจากนั้นจึงนำเห็ดหัวลิงที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาทำให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ทำการสกัดเห็ดหัวลิงด้วยวิธีการหมัก (Maceration technique) โดยการนำเห็ดหัวลิงที่ผ่านการบดแล้ว นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล ทำการหมักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำสารสกัดออกมารอง แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดไว้ที่โถดูดความชื้น (desiccator)

3.3 การสกัดโพลีแซคคาไรด์

3.3.1 การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำ

การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำ ดัดแปลงตามวิธีของ Zhang และคณะ, (2011) นำตัวอย่างกากใยที่ได้จากจากการหมักด้วยเมทานอล ไประเหยเอาเมทานอลออกด้วยตู้ดูดควัน จนตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างมา 15 กรัม นำมาใส่ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปทำสกัดด้วยเครื่อง Ultrasonic Cleaner ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงต่อด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปตกตะกอนข้ามคืนด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 2 เท่าของสารสกัด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของตะกอนนั้นเติมเอทานอล 70% เพื่อทำการล้างด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนของตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่าง

นำตัวอย่างแห้งที่ผ่านการบดและอบแห้งแล้ว 15 กรัม ใส่ลงในขวดดูแรน (Duran) ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปแล้วจึงนำไปทำสกัดด้วยเครื่อง Ultrasonic Cleaner ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงต่อด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปตกตะกอนข้ามคืนด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 2 เท่าของสารสกัด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของตะกอนนั้นเติมเอทานอล 70% เพื่อทำการล้างด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนของตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ ทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay (Cai และคณะ, 2012) โดยเตรียมสารสกัดเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 2 – 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย ABTS ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.02 นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยตัวควบคุมที่ใช้คือเมทานอลต่อสารละลาย ABTS ในอัตราส่วน 1:10 Blank ที่ใช้คือ สารสกัดต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 และใช้สารละลายโทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน

คำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ

$$\% \text{ ABTS Scavenging} = \left(\frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \right) \times 100$$

- โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control
 B คือ ค่าการดูดกลืนแสง Blank of control
 C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample
 D คือ ค่าการดูดกลืนแสง Blank of sample

3.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method (Masuda และคณะ, 2005) เริ่มต้นจากการเตรียมตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการหยอดตัวอย่างลงใน 96 well-plate โดยปริมาตรที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.1 ในการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ต้องอยู่ในสถานะที่เย็น จากนั้นทำการผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปตั้งทิ้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำมาเติม L-Dopa ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และนำไปตั้งไว้ที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibition} = \left(\frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \right) \times 100$$

- โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control
 B คือ ค่าการดูดกลืนแสง Blank of control
 C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample
 D คือ ค่าการดูดกลืนแสง Blank of sample

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงชุดทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

	ชุดทดสอบ	Phosphate buffer (μl)	Sample Solution (μl)	Tyrosinase Solution (μl)
A	Control	120	-	40
B	Blank of control	160	-	-
C	Sample	80	40	40
D	Blank of sample	120	40	-

ที่มา : สุกัญญา เดชอดิษฐ์ และคณะ, (2012)

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปราย

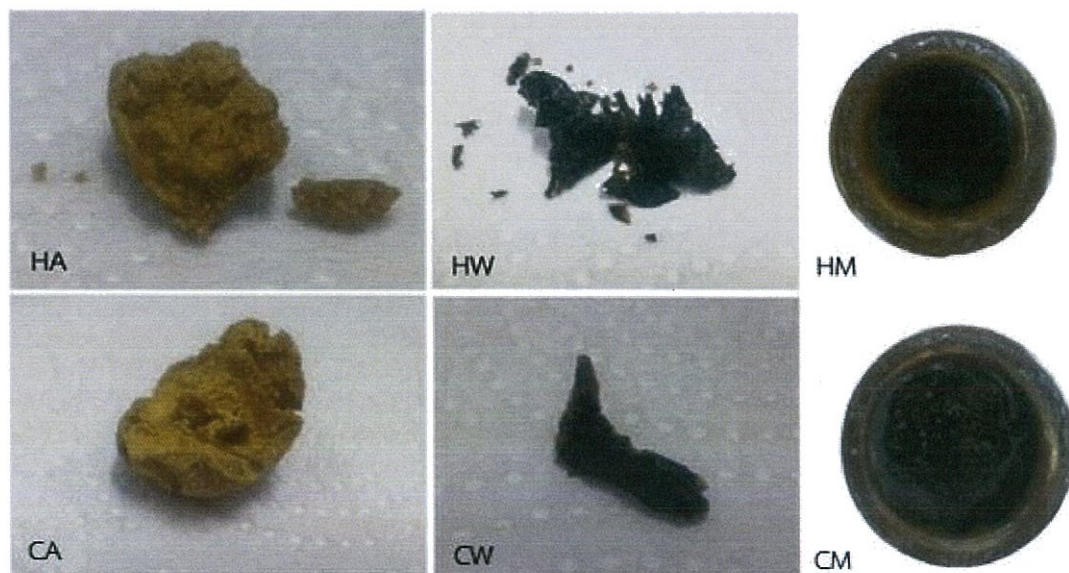
4.1 ผลการสกัดสาร

จากการสกัดสารต่าง ๆ ในเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง โดยการสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างและน้ำ น้ำหนักของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิงที่ผ่านการอบลมร้อนเริ่มต้น 15 กรัม พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง มีค่าร้อยละผลได้ เท่ากับ 48.10 และ 51.14 ส่วนสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง มีค่าร้อยละผลได้ เท่ากับ 3.51 และ 7.53 และในการสกัดด้วยเมทานอล น้ำหนักของเห็ดมิลค์กี้ที่ผ่านการอบลมร้อนเริ่มต้น 100 กรัม และมีค่าร้อยละผลได้ เท่ากับ 48.22 ส่วนของเห็ดหัวลิง น้ำหนักของเห็ดหัวลิงที่ผ่านการอบลมร้อนเริ่มต้น 3.8 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าร้อยละผลได้ เท่ากับ 1.40 ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลได้ของสารสกัดต่าง ๆ ในเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง

สารสกัด	ร้อยละผลได้ (%)
สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้	48.22
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้	48.10
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้	3.51
สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง	1.40
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง	51.14
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง	7.53

เมื่อทำการสกัดสารต่าง ๆ ของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิงมีสีน้ำตาลเข้มจนดำ ไม่มีกลิ่น ส่วนสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ จะมีสีน้ำตาล ไม่มีกลิ่น ส่วนสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง มีสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีกลิ่น และสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้จะมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นคล้ายถั่ว ส่วนสารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิงมีสีน้ำตาลเข้ม และมีกลิ่นรุนแรงคล้ายเนื้อสัตว์ ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดต่าง ๆ จากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้

HA : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง

CA : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้

HW : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง

CW : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้

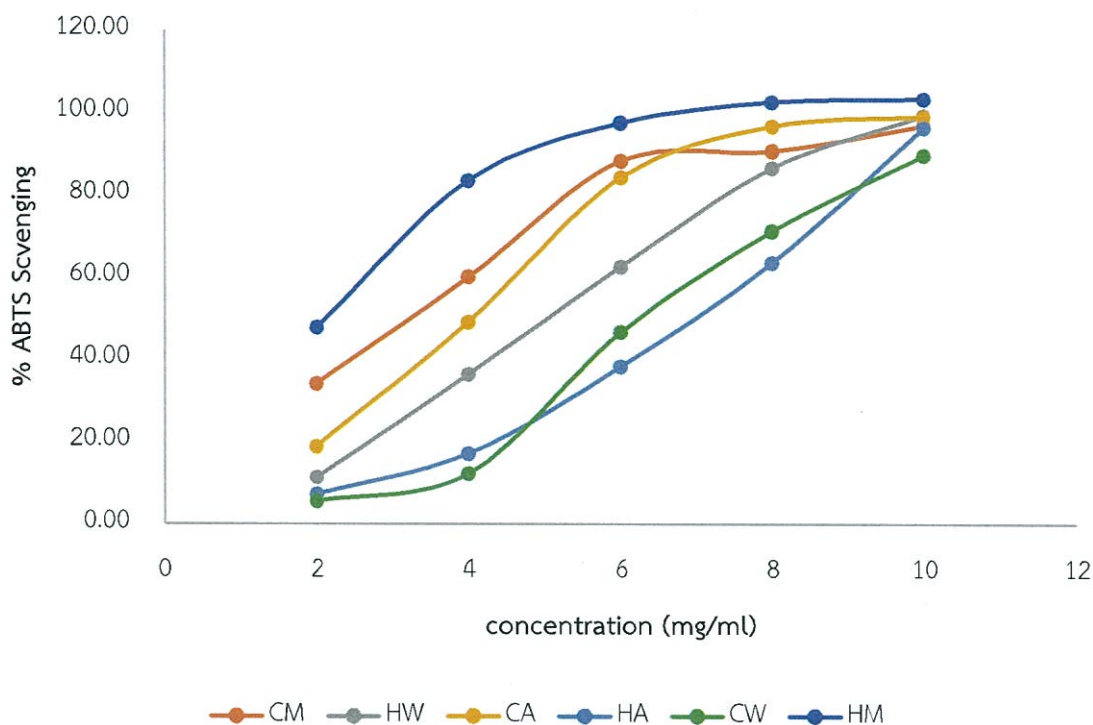
HM : สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง

CM : สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้

ที่มา: นฤกร หอมเปาะ

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากสารสกัดต่าง ๆ ของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ โดยทำการทดสอบในแต่ละความเข้มข้นตั้งแต่ 2 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.2 พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดสามอันดับแรก คือ สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง และสารสกัดด้วยโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ มีค่าเท่ากับ 103.29%, 99.21% และ 98.95% ตามลำดับ สามอันดับรองลงมาคือ สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง และสุดท้ายสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้ ซึ่งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 96.71%, 96.32% และ 89.51% ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ

HM : สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง

CM : สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้

HA : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง

CA : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้

HW : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง

CW : สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้

ตารางที่ 4.2 ค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากสารสกัดในเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

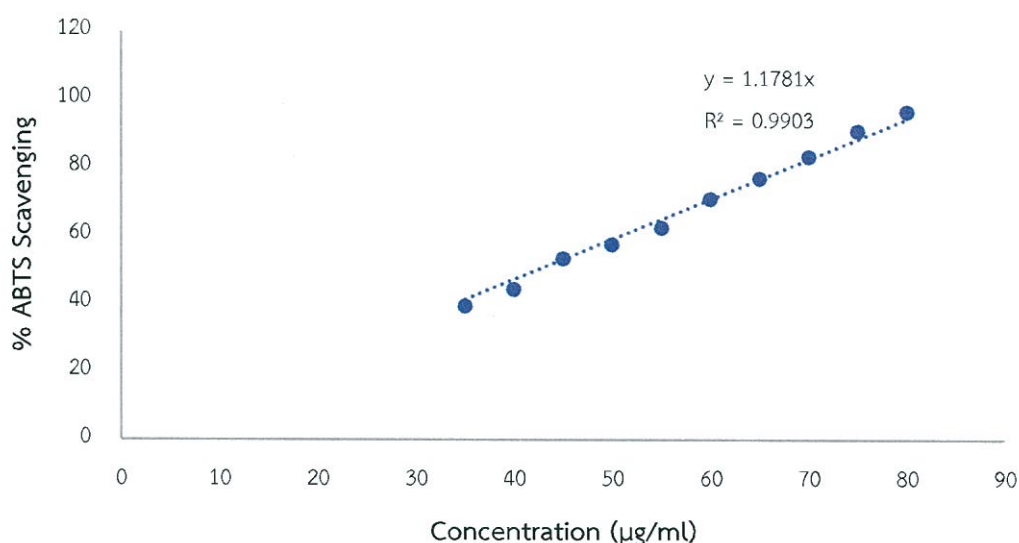
ความเข้มข้น (mg/ml)	HM	HA	HW	CM	CA	CW
10	103.29	96.32	99.21	96.71	98.95	89.51
8	102.50	63.42	86.48	90.53	96.60	71.09
6	97.42	38.17	62.44	88.14	84.10	46.50
4	83.40	17.00	36.33	59.91	48.95	12.19
2	47.63	7.11	11.26	34.01	18.75	5.46

จากรูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และความเข้มข้นของสารสกัดต่าง ๆ นำมาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} หรือ 50% Inhibition concentration พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงมีค่า IC_{50} มากที่สุดเท่ากับ 6.49 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร และในสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ

ตารางที่ 4.3 ค่า IC_{50} ของของสารสกัดต่าง ๆ ในเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี

สารสกัด	IC_{50} (mg/ml)
สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี	4.35
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี	4.39
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี	6.10
สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง	2.71
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง	6.17
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง	4.49



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของโพลีฟีนอล (µg/ml)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของโพลีฟีนอล (µg/ml) ในรูปที่ 4.3 นำมาวิเคราะห์หาสมการเส้นตรงเพื่อใช้หาปริมาณโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในแต่ละสารสกัดต่าง ๆ (µg TEAC/mg extract) พบว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิงมีปริมาณโพลีฟีนอลอยู่ 17.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารสกัด และในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงมีปริมาณโพลีฟีนอลอยู่ 4.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสารสกัด ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

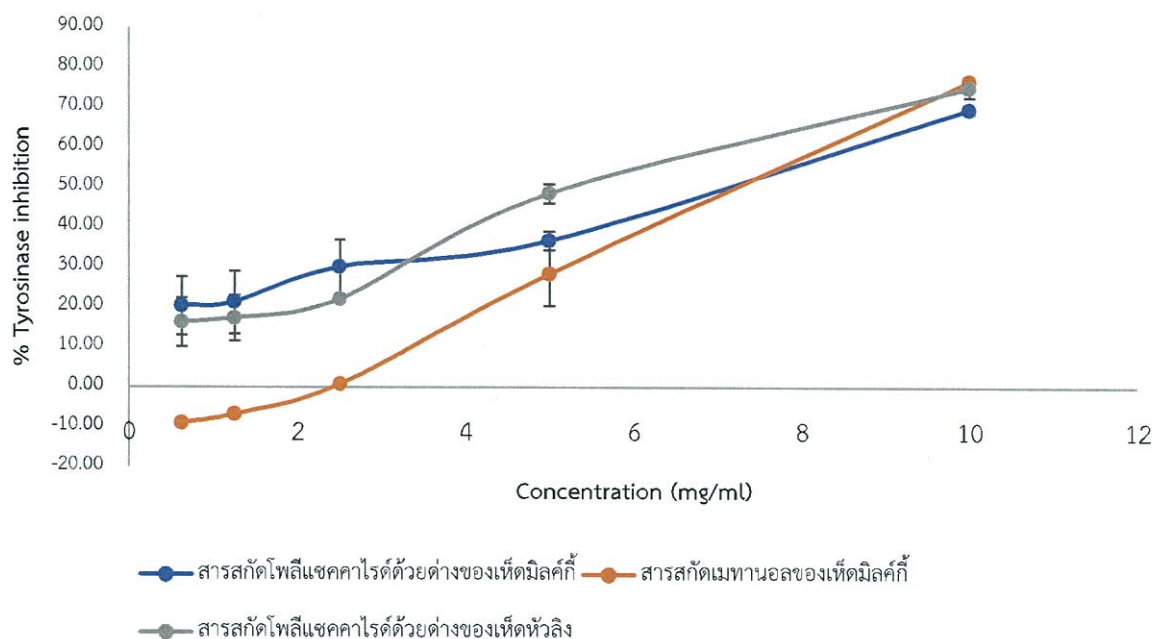
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณโพลีฟีนอลต่อปริมาณสารสกัด ($\mu\text{g TEAC/mg extract}$)

สารสกัด	$\mu\text{g TEAC/mg extract}$
สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้	12.59
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้	10.84
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดมิลค์กี้	4.24
สารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง	17.73
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง	4.01
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิง	8.54

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ พบว่าสารสกัดเมทานอลซึ่งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด เท่ากับ 103.29% ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ มีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Han และคณะ, (2015) พบว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดเท่ากับ 92.8% เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเอทิล อะซิเตทและอะซิโตน

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดด้วยเมทานอล และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างและน้ำจากเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ พบว่าในสารสกัดเมทานอลจากเห็ดหัวลิง และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ต่ำกว่า 50% ส่วนสารสกัดเมทานอลจากเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างจากเห็ดหัวลิงและสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ที่ 81.59, 74.43 และ 78.18 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} หรือ 50% Inhibition concentration โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดต่างๆ ดังรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้, สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง

เมื่อคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง ได้ค่าแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

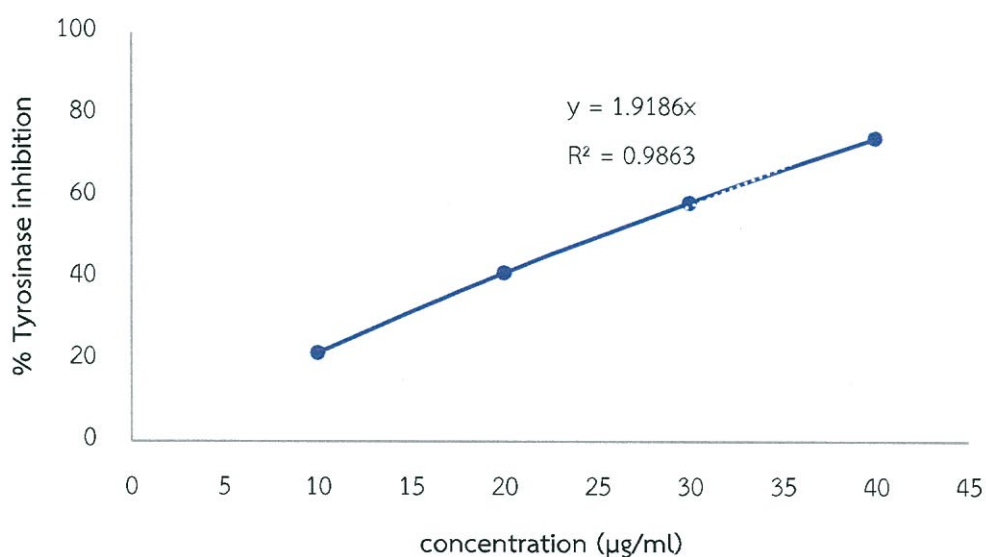
ความเข้มข้น (mg/ml)	เห็ดมิลค์กี้ (<i>Calocybe indica</i>)		เห็ดหัวลิง (<i>Hericium erinaceus</i>)
	เมทานอล	โพลีแซคคาไรด์ด้วยต่าง	โพลีแซคคาไรด์ด้วยต่าง
10	76.57 ± 1.15	75.05 ± 2.35	69.55 ± 0.96
5	28.35 ± 7.87	48.52 ± 2.45	36.69 ± 2.28
2.5	0.64 ± 0.09	22.01 ± 0.37	30.02 ± 6.89
1.25	-6.88 ± 0.85	17.28 ± 5.65	21.19 ± 7.84
0.625	-9.03 ± 0.22	16.19 ± 6.08	20.33 ± 7.33

จากตารางที่ 4.5 พบว่าในสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ที่ความเข้มข้น 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงถึง 75.41 เมื่อเทียบกับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารสกัดต่างๆ พบว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.28, 6.63 และ 6.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า IC_{50} ของสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงและสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้

สารสกัด	IC_{50} (mg/ml)
สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้	7.28
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้	6.63
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง	6.01



รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก

เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่อปริมาณสารสกัด โดยใช้สมการเส้นตรงจากรูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก พบว่าในสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ด

มิลค์กี้ และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง มีค่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่อปริมาณสารสกัด เท่ากับ 3.47 3.73 และ 4.52 $\mu\text{gAAE}/\text{mg extract}$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าปริมาณกรดแอสคอร์บิกต่อปริมาณสารสกัด

สารสกัด	$\mu\text{gAAE}/\text{mg extract}$
สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้	3.47
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดมิลค์กี้	3.73
สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง	4.52

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด เท่ากับ $76.57\% \pm 1.15$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำคำนวณหาค่า IC_{50} กลับพบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงมีค่าเท่ากับ 20.33% แต่สารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดกลับมีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ -9.03% ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่นๆในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิงสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยสารสกัดเมทานอล โพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างและน้ำของเห็ดมิลค์กี้และเห็ดหัวลิง พบว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดหัวลิง มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เท่ากับ 2.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 6.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น ๆ แต่ในทางกลับกันสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยต่างของเห็ดหัวลิง มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 6.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุด ส่วนสารสกัดเมทานอลของเห็ดมิลค์กี้ มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 7.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุด จึงสรุปได้ว่าค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระจะมีค่าแปรผกผันกับค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) หากมีเวลามากพอควรจะทำการเพาะเลี้ยงเห็ด เพื่อดูการเจริญเติบโตและสามารถนำส่วนของไมซีเลียมของเห็ดมาทำการสกัดเพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ต่อไป
- 2) ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหัวลิงและเห็ดมิลค์กี้ ด้วยวิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น DPPH radical scavenging assay และ FRAP radical scavenging assay เป็นต้น
- 3) ควรหาแหล่งเพาะปลูกเห็ดจากแหล่งอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น จากแหล่งเพาะปลูกตามธรรมชาติ หรือจากโรงงานเพาะปลูกเห็ด

เอกสารอ้างอิง

- เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์*. 1(1) : 59-70.
- ชัยศักดิ์ จันครินิยม, มยุรี กัลยาวัฒนกุล และ อรวีรสสา เผือกสุข. 2012. “ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดฟางเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง.” *วารสารวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง*. : 1-9.
- นุรฮายานา โต๊ะเก็ง, มาริณี ปลาบง, สุกัญญา เดชอดิษฐ์, อาริณา ดาราบากอ และ อัสมัน ตีอลง. 2555. “ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทำให้ผิวขาว.” *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*. 15(2) : 44-51.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณค์. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3) : 276-286.
- มูฮำหมัด นิยมเดชา และดวงพร โลพะวิทยานันท์. 2559. “การสังเคราะห์อนุพันธ์โอเซลทามิเวียร์เพื่อใช้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส(ทำให้ผิวขาว).” *Veridian E-journal, Science and Technology Silpakorn University*. 3(5) : 66-81.
- เรณู คำหอม. 2559. “การทดสอบสารพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของปีบ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ลุงลี. 2013. “คุยเรื่องเห็ดหัวลิง, เห็ดภู่มาลา, เห็ดปุยฝ้าย, เห็ดหนูมาน, เห็ดโกกุกหรือเห็ดยามาบูชิทาเกะ.” [online]. เข้าถึงได้ : http://www.thaimushroomsoc.com/index.php?lay=BoaRdshow&ac=webboard_show&WBntype=1&No=1446331.
- Ana, C.G.F., Federico, M.D., Juan, M. S.P. and Loreto, R.H. 2008. “Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms.” *Techociencia Chihuahua*. 2(2) : 95-107.
- Bokeria, K., Balsundram, S.K., Bhattarai, I. and Kaphle, K. 2014. “Commercial production of Milky Mushroom (*Calocybe indica*).” *Merit Research Journals*. 2(2) : 32 - 37.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Harold, C. 2004. “Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 74 : 2157-2184.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chien, C.C., Tsai, M.L., Chen, C.C., Chang, S.J. and Tseng C.H. 2008. "Effects on Tyrosinase Activity by the Extracts of *Ganoderma lucidum* and Related Mushrooms." *Mycopathologia*. 166(2) : 117-120.
- Chris, D.M. and Jason, E. B. 2005. "Medicinal Mushrooms A Selective Overview." *Alternative & Complimentary Therapies*. 11(3) : 141-145.
- Govindan, S., Johnson, E. E. R., Christopher, J., Shanmugam, J., Thirumalairaj, V. and Gopaland, V. 2016. "Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Calocybe indica* var. APK2." *Experimental and Toxicologic Pathology*. 68(6) : 329-334.
- Halliwell Barry. 1999. "Antioxidant defense mechanism: From the beginning to the end." *Free radical Research*. 31(4) : 261-272.
- Han, S.R., Jun, A.J., Yang, H.S. and Oh, T.J. 2015. "Comparison of Physiological Activity of Solvent Extracts from *Heridium erinaceus*." *Indian Journal of Science and Technology*. 25(8) : 1-7.
- Hsu Ching-Yu. 2013. "Evaluation of antioxidant properties of some commercially available culinary and medicinal mushrooms from Taiwan." PH.D. Thesis of Agriculture, Food and Rural Development Faculty of Science, Agriculture and Engineering Newcastle University.
- Jane, E. R., Erika, D.N. and Robert, A. S. 2010. "Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature." *Nutrition Journal*. 9(54) : 1-22.
- Kaewnarin, K., Suwannarach, N., Kumla, J and Lumyong, S. 2016. "Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities." *Journal of Functional Foods*. (27) : 352-364.
- Khan, A., Tania, M., Liu R. and Rahman, M.M. 2013. "*Heridium erinaceus*: an edible mushroom with medicinal values." *Journal of Complimentary and Integrative Medicine*. 10(1) : 1-6.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Krishnamoorthy, A.S., and Venkatesh, B. 2015. "A Comprehensive Review of Tropical Milky White Mushroom (*Calocybe indica* P&C)." *Mycobiology*. 43(3) : 184 - 194.
- Li, X., Wang, Z., Wang, L., Walid, E. and Zhang, H. 2012. "In Vitro Antioxidant and Anti-Proliferation Activities of Polysaccharides from Various Extracts of Different Mushrooms." *International Journal of Molecular Sciences*. 13(5) : 5801-5817.
- Luo, C. and Chen, S. 2010. "Optimization of extraction technology of Se-enriched *Hericium erinaceum* polysaccharides by Box–Behnken statistical design and its inhibition against metal elements loss in skull." *Carbohydrate Polymers*. 82(3) : 854-860.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. and Yonemori, S. 2005. "Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*." *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 69 : 197–201.
- Mirunalini, S., Dhamodharan, G. and Deepalakshmi, K. 2011. "Antioxidant potential and current cultivation aspects of an edible milky mushroom (*Calocybe indica*)" *International journal of pharmacy and pharmaceutical science*. 1(4) : 137- 143.
- Pannala, V.R., Youseph, A.S.K., Sharad, B. and Venkatesh, K.V. 2011. "Dynamic analysis of the KLGAL regulatory system in *Kluyveromyces lactis*: a comparative study with *Saccharomyces cerevisiae*." *Systems and Synthetic Biology Journal*. 5(1-2):69-85
- Park, K.M., Kwon, K.M. and Lee, S.H. 2015. "Evaluation of the Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Property from Mycelium Culture Extracts." *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. : 1-7.
- USDA National Nutrient Database for Standard Maryland United States Department of Agriculture. 2015 [online]. เข้าถึงได้จาก <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3023?fgcd=&manu=&lfacet=&form1at=&count=&max=35&offset=&sort=&qlookup=mushroom#id-a>

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wang, M.X., Gao, Y., Xu, D., Konishi, T. and Gao, Q. 2014. “*Hericium erinaceus* (Yamabushitake): a unique resource for developing functional foods and medicines.” *Food and Function*. 5(12) : 3055-3064.
- Yoon, K.M., Alam, N., Lee, K.R., Shin, P.G., Cheong, J.H., Yoo, Y.B. and Lee, T.S. 2011. “Antioxidant and Antityrosinase Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of *Lentinus lepideus*.” *Molecules*. 16(3) : 2334-2347.
- Zhang, Z., Guoying, L., Pan, H., Pandey, A., He, W. and Fan, L. 2012. “Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 51(5) : 1140-1146

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์	3	มิลลิกรัม
2. เมทานอล	3	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารละลายมาตรฐานโทรล็อกซ์ ปริมาณ 3 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 3 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ABTS)

สารเคมี

1. สาร Potassium sulphate	6.62	มิลลิลิตร
2. สาร ABTS	10	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

4. เมทานอล

วิธีการเตรียม

1. เตรียมสาร Potassium sulphate ความเข้มข้น 0.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร Potassium sulphate ปริมาณ 6.62 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

2. เตรียมสาร ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร ABTS ปริมาณ 38.14 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3. นำสาร Potassium sulphate ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสาร ABTS ที่ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4. นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง

5. เมื่อครบเวลา ก่อนใช้งานนำมาเจือจางด้วยเมทานอล และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าเท่ากับ 0.70 ± 0.02

ภาคผนวก ก (ต่อ)

3. การเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์	2	กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	500	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 2 กรัม นำไปละลายกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

4. การเตรียม L-Dopa

สารเคมี

สาร L-dopa	2.46	กรัม
สาร Phosphate buffer	5	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสาร L-dopa ให้ได้ปริมาณ 2.46 กรัม
2. นำไปละลายด้วย Phosphate buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร