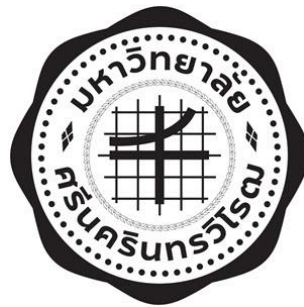




ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เพื่อใช้เป็นทางเลือกในส่วนผสมเวชสำอาง
BIOLOGICAL ACTIVITIES OF POLYPORE MUSHROOM EXTRACTS FOR USE AS AN
ALTERNATIVE IN COSMECEUTICAL INGREDIENTS

เบญจวรรณ กรินทร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2567

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เพื่อใช้เป็นทางเลือกในส่วนผสมเวชสำอาง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF POLYPORE MUSHROOM EXTRACTS FOR USE AS AN
ALTERNATIVE IN COSMECEUTICAL INGREDIENTS



An Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2024

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เพื่อใช้เป็นทางเลือกในส่วนผสมเวชสำอาง
ของ
เบญจวรรณ กรินทร์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐิกา สุวรรณาสรี)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันทน์ นันทวิสัย)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เพื่อใช้เป็นทางเลือกในส่วนผสมเวชสำอาง
ผู้วิจัย	เบญจวรรณ กรินทร์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2567
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐริกา สวรรณาครีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เชิดชัย โพธิ์ศรี

เห็ดในกลุ่มโพลีพอร์เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเห็ดโพลีพอร์จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Coriopsis dendriformis* PW17-134, *Cubamycetes lactineus* PW17-03, *Funalia aspera* NP17-02, *Microporus vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-16, *Trametes hirsuta* PW17-41, *T. sanguinea* PP17-18, *Ganoderma fornicatum* PW17-199, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-111 และ *Ganoderma* sp. PP22-01 โดยการสกัดสารทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ได้สารสกัดจำนวน 33 ตัวอย่าง ซึ่งสารทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งพบปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในปริมาณที่แตกต่างกัน จากนั้นคัดเลือกสารสกัดจากเห็ด 6 สายพันธุ์ (*C. dendriformis*, *F. aspera*, *G. lingzhi*, *M. vernicipes*, *M. xanthopus* และ *T. hirsuta*) 18 ตัวอย่างของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ HaCaT ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 ที่ความเข้มข้น 62.5 ถึง 125 µg/mL จากผลของฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 6 ตัวอย่าง จากเห็ด *C. dendriformis*, *F. aspera* และ *G. lingzhi* ได้นำไปวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ผลการวิเคราะห์พบสารที่สอดคล้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอาง เช่น สารสกัดเห็ด *G. lingzhi* พบ 3,4-dihydroxybenzoate, glyoxylic acid และวิตามิน B3, B5, B7 และ B12 ส่วนสารสกัดเห็ด *C. dendriformis* พบ 2-hydroxycinnamic acid ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านคอลลาเจน และด้านการอักเสบ ในขณะที่สารสกัดเห็ด *F. aspera* พบ 3,4-dihydroxybenzoate, vanillin และ adenosine จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเห็ดโพลีพอร์มีประสิทธิภาพสามารถใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณค่าสำหรับการพัฒนาเวชสำอางได้ในอนาคต

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ, ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ความเป็นพิษต่อเซลล์, เมตาโบไลต์, เห็ดโพลีพอร์

Title	BIOLOGICAL ACTIVITIES OF POLYPORE MUSHROOM EXTRACTS FOR USE AS AN ALTERNATIVE IN COSMECEUTICAL INGREDIENTS
Author	BENCHAWAN KARIN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2024
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Nuttika Suwannasai
Co Advisor	Associate Professor Dr. Cherdchai Phosri

Mushrooms, particularly polypore species, are rich sources of bioactive compounds with potential applications in cosmeceutical formulations. This study investigated 11 polypore mushroom species, including *Coriolopsis dendriformis* PW17-134, *Cubamyces lactineus* PW17-03, *Funalia aspera* NP17-02, *Microporus vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-16, *Trametes hirsuta* PW17-41, *T. sanguinea* PP17-18, *Ganoderma fornicatum* PW17-199, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-111, and *Ganoderma* sp. PP22-01. Extracts were obtained from mycelia and culture broth using ethyl acetate and ethanol, yielding 33 distinct extracts. All extracts exhibited antioxidant, anti-inflammatory, and tyrosinase inhibitory activities, along with varying total phenolic content. Among them, six species (*C. dendriformis*, *F. aspera*, *G. lingzhi*, *M. vernicipes*, *M. xanthopus*, and *T. hirsuta*) demonstrated high bioactivity. Eighteen extracts were further evaluated for cytotoxicity against HaCaT keratinocyte cells using the MTT assay. Most extracts maintained over 90% cell viability at concentrations of 62.5 to 125 µg/mL. Based on bioactivity and cytotoxicity results, six highly potent extracts from *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02, and *G. lingzhi* PW17-43 were selected for untargeted metabolomic analysis using LC-MS/MS to identify their metabolic profiles. The results revealed a diverse range of bioactive compounds relevant to cosmeceutical applications. *G. lingzhi* PW17-43 contained 3,4-dihydroxybenzoate, glyoxylic acid, and vitamins B3, B5, B7, and B12, while *C. dendriformis* PW17-134 was rich in 2-hydroxycinnamic acid, known for its antioxidant, anti-collagenase, and anti-inflammatory activities. *F. aspera* NP17-02 contained 3,4-dihydroxybenzoate, vanillin, and adenosine. These findings highlight the potential of polypore mushrooms as valuable sources of bioactive compounds for cosmeceutical applications.

Keyword : antioxidant, anti-tyrosinase, cytotoxicity, metabolomics, polypores

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาและการช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐริกา สวรรณาศรัย อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์หลัก และ รองศาสตราจารย์ ดร.เชิดชัย โพธิ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการอบรมและชี้แนะแนวทางในการทำวิจัยและปริญญานิพนธ์เล่มนี้จนมีความครบถ้วนสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอก แสงวิเชียร อาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานกรรมการในการสอบปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขวัญนันท นันทวิสัย อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ ตลอดจนอำนวยความสะดวกเรื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เครือวัลย์ โชติเลิศศักดิ์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ให้ความรู้ทางด้านจุลชีววิทยา ตลอดจนเทคนิคในการปฏิบัติการต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ นายพิสิฐ ธรรมวิทยากร ผู้ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อข้อมูลตัวอย่างเห็ดโพลีพอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (Grant no. PRP6505031560) ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มอบทุนการศึกษานับสนุนการเข้าร่วมประชุมและเสนอผลงานระดับนานาชาติของนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (GRAD-S-3-67)

ขอขอบพระคุณ นางสาวพิชชาภา ธงสุวรรณ นางสาวพิชญา คงเมือง และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านตลอดจนพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือเสมอมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่สาว คุณตา และคุณยาย ที่สนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เบญจวรรณ กรินทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตงานวิจัย.....	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	3
บทที่ 2.....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. เห็ดกลุ่มโพลีพอร์ (polypores) ในประเทศไทย.....	4
2. บทบาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดราในด้านเวชสำอาง.....	6
2.1 การต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.2 สารประกอบฟีนอล.....	12
2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	16
2.4 การต้านการอักเสบ.....	19
3. ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดและการวิเคราะห์ชนิดของสาร.....	21

3.1 การวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	23
4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ผิวหนัง.....	25
บทที่ 3.....	27
วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
1. อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	27
2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	28
3. ระเบียบวิธีวิจัย	30
3.1 ตัวอย่างเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ที่ศึกษาในงานวิจัย	30
3.2 การระบุชนิดของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	31
และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)	31
3.3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดกลุ่มโพลีพอร์และการสกัดสารออกฤทธิ์.....	33
3.4 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดกลุ่ม.....	36
โพลีพอร์.....	36
3.5 การหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content) จาก.....	38
สารสกัดของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์	38
3.6 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ด้วยวิธี NO radical scavenging.....	38
activity.....	38
3.7 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	39
3.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์	40
3.9 การวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ทั้งหมดด้วยวิธี Liquid chromatography-mass.....	43
spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS).....	43
3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	43
บทที่ 4.....	44
ผลการทดลอง	44

1. เห็ดโพลีพอร์ที่ใช้ในการศึกษา และการระบุชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	44
2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดและการสกัดสารออกฤทธิ์.....	49
3. คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอล ทั้งหมด	54
4. คุณสมบัติในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ด้วยวิธี NO radical scavenging activity	64
5. คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	66
6. ความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ต่อเซลล์ HaCaT ทดสอบด้วยวิธี MTT assay.....	68
6.1 สารสกัดจากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134.....	68
6.2 สารสกัดจากเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02.....	68
6.3 สารสกัดจากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43	71
6.4 สารสกัดจากเห็ด <i>T. hirsuta</i> PW17-41.....	71
6.5 สารสกัดจากเห็ด <i>M. vernicipes</i> PW17-173	71
6.6 สารสกัดจากเห็ด <i>M. xanthopus</i> PP17-16.....	74
7. การวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ด้วยวิธี Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS)	74
7.1 สารสกัดจากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134.....	75
7.2 สารสกัดจากเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02.....	82
7.3 สารสกัดจากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43	87
บทที่ 5.....	99
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	99
บรรณานุกรม.....	110
ภาคผนวก.....	125
ภาคผนวก ก.....	126

ภาคผนวก ก.....	127
สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	127
ภาคผนวก ข.....	130
ภาคผนวก ข.....	131
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....	131
ภาคผนวก ค.....	132
ภาคผนวก ค.....	133
ความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ต่อเซลล์ HaCaT ทดสอบด้วยวิธี MTT assay	133
ประวัติผู้เขียน.....	139



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ตัวอย่างการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์.....	11
ตาราง 2 ตัวอย่างกลุ่มสารออกฤทธิ์จากเห็ดราและฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	22
ตาราง 3 ตัวอย่างการวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดรา.....	24
ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	27
ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	28
ตาราง 6 ข้อมูลเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....	31
ตาราง 7 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS.....	32
ตาราง 8 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS.....	33
ตาราง 9 ปริมาตรของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	40
ตาราง 10 สัดส่วนของสารละลายเคลื่อนที่สำหรับใช้ในการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค UPLC.....	43
ตาราง 11 ลักษณะการเจริญของเห็ดโพลีพอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM.....	50
ตาราง 12 ปริมาณสารสกัดของเห็ดโพลีพอร์จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตท.....	53
ตาราง 13 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตทในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด.....	61
ตาราง 14 คุณสมบัติด้านการอักเสบของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เมื่อทดสอบด้วยวิธี NO radical scavenging activity.....	65
ตาราง 15 คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์.....	67
ตาราง 16 กลุ่มสารเมแทบอลิต์ที่พบในสารสกัดเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS.....	75

ตาราง 17 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134 และ สรรพคุณทางเวชสำอาง	76
ตาราง 18 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134 และ สรรพคุณทางเวชสำอาง	79
ตาราง 19 กลุ่มสารเมแทบอไลต์ที่พบในสารสกัดเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02 เมื่อวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS.....	82
ตาราง 20 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02 และสรรพคุณ ทางเวชสำอาง	83
ตาราง 21 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02 และสรรพคุณ ทางเวชสำอาง	86
ตาราง 22 กลุ่มสารเมแทบอไลต์ที่พบในสารสกัดเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43 เมื่อวิเคราะห์ด้วย เทคนิค LC-MS/MS.....	88
ตาราง 23 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43 และสรรพคุณ ทางเวชสำอาง	89
ตาราง 24 สารเมแทบอไลต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43 และสรรพคุณ ทางเวชสำอาง	92
ตาราง 25 การเปรียบเทียบชนิดของสารเมแทบอไลต์ที่ได้จากสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ 3 สายพันธุ์ จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตท	95
ตาราง 26 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ โคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	133
ตาราง 27 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>F. aspera</i> NP17-02 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	134
ตาราง 28 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	135
ตาราง 29 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	136

ตาราง 30 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>M. vernicipes</i> PW17-173 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	137
ตาราง 31 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>M. xanthopus</i> PP17-16 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	138



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ (a) <i>Abundisporus fuscopurpureus</i> , (b) <i>Coriolopsis glabrorigens</i> , (c) <i>Trametes hirsuta</i> , (d) <i>Polyporus dictyopus</i> , (e) <i>Microporus xanthopus</i> และ (f) <i>Irpex lacteus</i>	5
ภาพประกอบ 2 แผนภาพแสดงกระบวนการทำลายผิวจากแสงแดดและอนุมูลอิสระชนิด ROS....	8
ภาพประกอบ 3 แผนภาพปฏิบัติการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FIC assay	10
ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการสสารประกอบฟีนอล.....	14
ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างโครงสร้างของสารประกอบฟีนอล.....	15
ภาพประกอบ 6 กลไกของสารประกอบฟีนอลในการต้านอนุมูลอิสระ	16
ภาพประกอบ 7 แผนภาพโครงสร้างเซลล์ผิวหนังกำพวดที่ประกอบด้วยเซลล์เมลานโนไซต์ที่สร้างเม็ด สีเมลานินและเซลล์เคราติโนไซต์.....	17
ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการสร้างเม็ดสีเมลานินของเซลล์เมลานโนไซต์	18
ภาพประกอบ 9 แผนภาพบทบาทของไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากแมคโครฟาจในการทำลายเซลล์	19
ภาพประกอบ 10 แผนภาพแสดงวิธีต่าง ๆ ในการวัดการต้านการอักเสบในระดับห้องปฏิบัติการ	20
ภาพประกอบ 11 (a) ตำแหน่งของเคราติโนไซต์ในชั้นผิวหนังกำพวด (b) ลักษณะของเซลล์ เคราติโนไซต์	25
ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวอย่างเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์.....	35
ภาพประกอบ 13 ฟรุติติงบอดี้ของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ (a) <i>C. dendriformis</i> PW17-134, (b) <i>F. aspera</i> NP17-02, (c) <i>M. vernicipes</i> PW17-173, (d) <i>M. xanthopus</i> PP17-16, (e) <i>T. sanguinea</i> PP17-18, (f) <i>G. fornicatum</i> PW17-199, (g) <i>G. lingzhi</i> PW17-43, (h) <i>G. mastoporum</i> PW17-111, (i) <i>Ganoderma</i> sp. PP22-01 (j) <i>C. lactineus</i> PP17-03 และ (k) <i>T. hirsuta</i> PW17-41 Bars = 1 เซนติเมตร.....	45

ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (a) *C. dendriformis* PW17-134, (b) *C. lactineus* PP17-03, (c) *F. aspera* NP17-02, (d) *G. fornicatum* PW17-199, (e) *G. lingzhi* PW17-43, (f) *G. mastoporum* PW17-111, (g) *Ganoderma* sp. PP22-01, (h) *M. vernicipes* PW17-173, (i) *M. xanthopus* PP17-16, (j) *T. hirsuta* PW17-41 และ (k) *T. sanguinea* PP17-18 Bars = 1 เซนติเมตร.....46

ภาพประกอบ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) แคลมป์ คอนเนคชั่น (ลูกศร) และ (e) เบสิดิโอสปอร์ (ลูกศร).....47

ภาพประกอบ 16 ผลเจลิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 หลังจากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เลนที่ 1 คือ DNA ladder และเลนที่ 2 คือ ผลผลิต PCR บริเวณ ITS ขนาด 551 bp.....48

ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (a) *C. dendriformis* PW17-134, (b) *C. lactineus* PP17-03, (c) *F. aspera* NP17-02, (d) *G. fornicatum* PW17-199, (e) *G. lingzhi* PW17-43, (f) *G. mastoporum* PW17-111, (g) *Ganoderma* sp. PP22-01, (h) *M. vernicipes* PW17-173, (i) *M. xanthopus* PP17-16, (j) *T. hirsuta* PW17-41 และ (k) *T. sanguinea* PP17-18 Bars = 6 เซนติเมตร.....51

ภาพประกอบ 18 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BA) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC assay เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-i คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ 55

ภาพประกอบ 19 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC assay เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-h คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ 57

ภาพประกอบ 20 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากเส้นใย (ME) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC

assay เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-i คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$	58
ภาพประกอบ 21 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ (a) สารสกัดในส่วน BA, (b) สารสกัดในส่วน BE และ (c) สารสกัดในส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-g คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$	60
ภาพประกอบ 22 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>C. dendriformis</i> PW17-134 และ <i>F. aspera</i> NP17-02 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-e คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$	70
ภาพประกอบ 23 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>G. lingzhi</i> PW17-43 และ <i>T. hirsuta</i> PW17-41 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-e คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$	72
ภาพประกอบ 24 ผลของสารสกัดจากเห็ด <i>M. vernicipes</i> PW17-173 และ <i>M. xanthopus</i> PP17-16 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-d คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$	73

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลังและความสำคัญของปัญหา

เวชสำอาง (cosmeceutical products) เป็นผลิตภัณฑ์เสริมความงามที่มีสรรพคุณทางยา นอกจากจะช่วยเสริมบุคลิกภาพ เพิ่มความมั่นใจแล้ว ยังช่วยบำรุงผิวพรรณ ชะลอวัยได้อีกด้วย ทำให้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคอย่างมาก ซึ่งอุตสาหกรรมเวชสำอางในตลาดโลกปัจจุบันมีมูลค่ามากกว่า 2.46 แสนล้านบาท โดยมีอัตราการเติบโตสูงถึง 9.46% ต่อปี⁽¹⁾ เนื่องจากความต้องการของตลาดที่สูงทำให้ผู้ผลิตบางรายฉวยโอกาสเติมสารต้องห้าม เช่น ปรอท สเตียรอยด์ และกรดเรตินอิก ในผลิตภัณฑ์เพื่อให้เห็นผลลัพธ์ที่ชัดเจนรวดเร็วขึ้น แต่ส่งผลเสียกับผู้บริโภคในระยะยาว ทำให้เวชสำอางที่มีส่วนผสมจากธรรมชาติได้รับความสนใจเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงทั้งต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ทดแทนสารเคมีได้ สารสกัดจากธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้ในเวชสำอางมีแหล่งที่มาหลากหลาย เช่น พืชสมุนไพร ดอกไม้ สาหร่าย และจุลินทรีย์ เป็นต้น โดยเฉพาะจุลินทรีย์ในกลุ่มเห็ดราซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารวิตามิน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาสกัดหาสารออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้านการอักเสบ ด้านริ้วรอย ลดความหมองคล้ำ และเพิ่มความชุ่มชื้น ตัวอย่างเช่น สารสกัดจากเห็ดหอม *Lentinula edodes* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสามารถนำไปใช้ในเวชสำอางชะลอวัยได้ ส่วนสารสกัดจากเห็ด *Tricholoma matsutake* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และลดเลือนริ้วรอย สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางได้เช่นกัน⁽²⁾ นอกจากนี้สารสกัดจากเห็ด *Agaricus bisporus*, *A. hortensis*, *Ganoderma* spp. และ *Phellinus baumii* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตเม็ดสีเมลานินได้ ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจึงสามารถช่วยลดการผลิตเม็ดสีเมลานินได้อีกด้วย⁽³⁾ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เวชสำอางชั้นนำหลายชนิดได้นำสารสกัดจากเห็ดรามาใช้เป็นส่วนผสม เช่น “Aveeno Positively Ageless” ของจอห์นสันแอนด์จอห์นสัน ใช้สารสกัดจากเห็ด *L. edodes* และ *Ganoderma lucidum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการเร่งผลัดเซลล์ผิวใหม่ตามธรรมชาติ ลดเลือนริ้วรอย และต้านอนุมูลอิสระ ส่วนผลิตภัณฑ์ “Mega-mushroom” มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดสามชนิด ได้แก่ *Hypsizyus ulmarium*, *G. lucidum* และ *Cordyceps* sp. ซึ่งช่วยต้านอนุมูลอิสระ และเพิ่มความกระฉ่างใส เป็นต้น⁽²⁾ เนื่องจากมีเห็ดราเป็นจำนวนมากที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ แต่ยังไม่เคยทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน การสกัดสารออกฤทธิ์จากเห็ดราสามารถสกัดได้ทั้งจากส่วนของดอกเห็ด เส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสารสกัดทุกส่วนมีรายงานว่ามียุทธินทาง

ชีวภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเห็ดรา อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และวิธีในการสกัด โดยการศึกษาท่อน้ำถึงชนิดของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพจากเห็ดราพบว่า มีสารหลายกลุ่ม เช่น เลคติน (lectins), พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides), สารประกอบฟีนอล (phenols), เทอร์พีนอยด์ (terpenoids), เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และ สารระเหย (volatiles) เป็นต้น⁽⁴⁾ ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จากเห็ดราและนำไปใช้ในเวชสำอางได้แก่ เซราไมด์ (ceramides), เลนติแนน (lentinan), แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และ เรสเวอราทรอล (resveratrol) เป็นต้น^(2, 5)

โดยงานวิจัยนี้สนใจสารสกัดจากเห็ดราในกลุ่มโพลีพอร์ (polypores) ซึ่งจัดอยู่ในอันดับ (order) Polyporales คลาส (class) Agaricomycetes ไฟลัม (phylum) Basidiomycota มีลักษณะสำคัญคือได้ดอกเห็ดมักพบโครงสร้างเป็นรู (pores) จำนวนมาก ยกเว้นบางชนิดพบครีป (gills) เห็ดกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญบนต้นไม้ ต้นไม้ เปลือกไม้ ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติ⁽⁶⁾ บางชนิดเจริญร่วมกับรากพืชแบบเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) ประกอบด้วยหลายวงศ์ (family) ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกศึกษาวงศ์ Polyporaceae และ Ganodermataceae เนื่องจากเห็ดในกลุ่มนี้หลายชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ เติบโตเร็ว และมีรายงานว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอาง เช่น การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ การเพิ่มความกระจำใส และความชุ่มชื้น เป็นต้น ตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Polyporaceae ที่ใช้ในเวชสำอาง เช่น *Polyporus umbellatus* และ *Pycnoporus sanguineus* ส่วนตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Ganodermataceae เช่น *G. lucidum* หรือเห็ดหลินจือ เป็นต้น⁽⁷⁾ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีทรัพยากรธรรมชาติที่หลากหลาย รวมทั้งเห็ดรา โดยเฉพาะวงศ์ Polyporaceae พบจำนวนไม่น้อยกว่า 16 สกุล (*Abundisporus*, *Coriolopsis*, *Datronia*, *Echinochaete*, *Epithele*, *Flabellophora*, *Fomitella*, *Grammothele*, *Megasporoporia*, *Pereniporia*, *Polyporus*, *Porogramme*, *Pseudolagarobasidium*, *Pycnoporus*, *Skeletocutis* และ *Trametes*) ส่วนวงศ์ Ganodermataceae พบจำนวน 2 สกุล (*Amauroderma* และ *Ganoderma*)⁽⁸⁻¹⁰⁾ อย่างไรก็ตามจากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเห็ดราในกลุ่มโพลีพอร์ในประเทศไทยมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอางจำนวนน้อย ทั้ง ๆ ที่มีความหลากหลายของชนิดเห็ดราเป็นจำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดราในกลุ่มดังกล่าวเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านเวชสำอางในอนาคต

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดราบริสุทธิ์ในกลุ่มโพลีพอร์ ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล
2. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดราที่ได้ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

3. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดราที่คัดเลือกต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ (keratinocytes) ชนิด HaCaT
4. เพื่อศึกษาชนิดของสารเมแทบอลไลต์ทั้งหมด (metabolomic) ของสารสกัดจากเห็ดราที่คัดเลือก ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ขอบเขตงานวิจัย

ตัวอย่างเห็ดราบริสุทธิ์กลุ่มโพลีพอร์ จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย จำนวน 10 สายพันธุ์ โดย Thamvithayakorn และคณะ⁽⁹⁾ และอีก 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดอกเห็ดสกุล *Ganoderma* sp. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม แล้วแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ วัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด คุณสมบัติในการต้านการอักเสบ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นคัดเลือกสารสกัดที่มีคุณสมบัติที่ดี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ และวิเคราะห์ชนิดของสารเมแทบอลไลต์ทั้งหมดด้วยเทคนิค LC-MS/MS เพื่อหาชนิดของสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติทางด้านเวชสำอาง

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. สารสกัดจากเห็ดรากลุ่มโพลีพอร์ จำนวน 11 สายพันธุ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ทั้งจากส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้
2. ข้อมูลความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดรากลุ่มโพลีพอร์ ต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ และชนิดของสารเมแทบอลไลต์ทั้งหมดของสารสกัดที่คัดเลือกเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
3. แหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติด้านเวชสำอางจากเห็ดรากลุ่มโพลีพอร์ที่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ และยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน รวมทั้งขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและการสกัดสารดังกล่าว

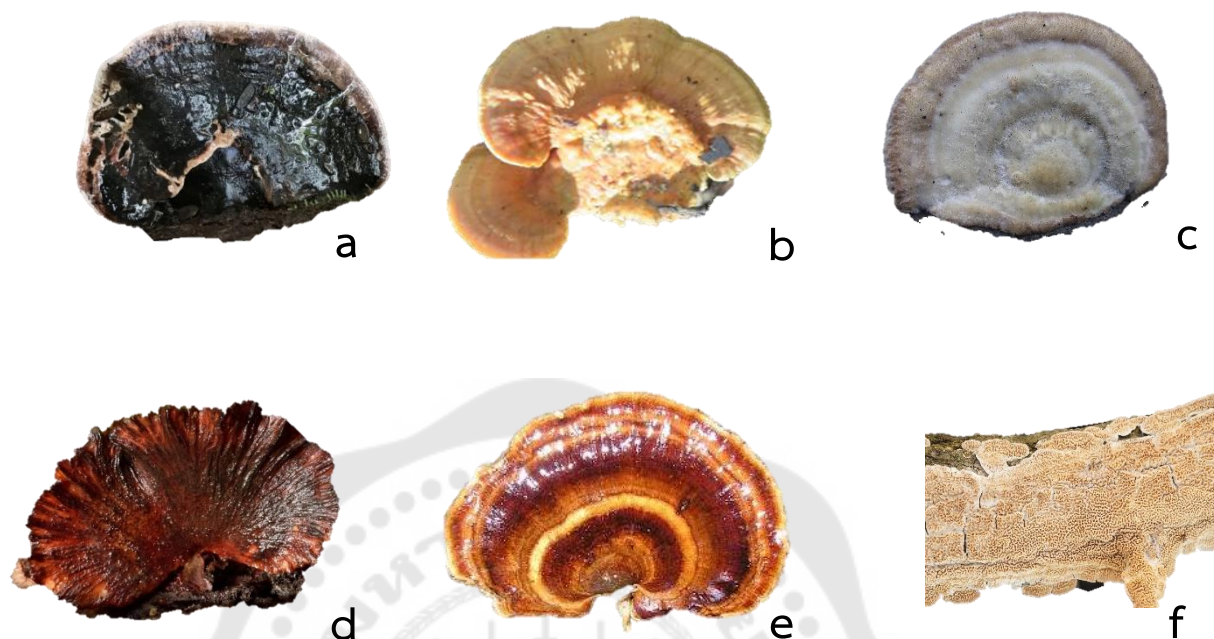
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เห็ดกลุ่มโพลีพอร์ (polypores) ในประเทศไทย

ประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ เนื้อเส้นศูนย์สูตรจัดอยู่ในโซนร้อนชื้น ทำให้มีความหลากหลายชีวภาพสูง ทั้งพันธุ์พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ รวมทั้งเห็ดรา โดยเฉพาะเห็ดในกลุ่ม “polypores” ซึ่งมาจากภาษากรีก คำว่า “poly” แปลว่าจำนวนมาก และคำว่า “poros” แปลว่ารู ดังนั้น “polypores” จึงหมายถึงรูจำนวนมาก ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม (phylum) Basidiomycota มีลักษณะของดอกเห็ด (fruiting body) ที่หลากหลาย บางชนิดเรียกว่า “bracket fungi” หรือ “shelf fungi” หรือ เห็ดหิ้ง เห็ดกระเปาะ เป็นต้น เห็ดกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีลักษณะเด่นตามชื่อกลุ่มคือได้ดอกเห็ดพบโครงสร้างเป็นรู (pores) จำนวนมาก แต่บางชนิดมีลักษณะเป็นครีบ (gills) พบการเจริญส่วนใหญ่บริเวณโคนต้นไม้ ตอไม้ และท่อนไม้ ในขณะที่บางชนิดพบการเจริญร่วมกับรากพืชชั้นสูงแบบเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) บางชนิดมีลักษณะของดอกเห็ดเป็นแผ่นราบติดกับเปลือกไม้เรียกว่า “corticoid fungi” หรือ “resupinate polypore fungi” (ภาพประกอบ 1) ซึ่งบทบาทหลักของเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ คือ เป็นผู้ย่อยสลาย ช่วยหมุนเวียนสารอาหารในระบบนิเวศ พบมากในพื้นที่ป่าธรรมชาติที่มีต้นไม้ใหญ่และไม้ล้ม แต่พบน้อยในพื้นที่ป่าปลูกใหม่ ดังนั้นเห็ดกลุ่มนี้จึงมีแนวโน้มที่จะลดลงและถูกคุกคามรวมทั้งสูญเสียพันธุ์เนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่า ทำให้เห็ดถูกทำลายไปด้วย ประเทศไทยเคยยุโรปยกให้เห็ดในกลุ่มโพลีพอร์เป็นตัวชี้วัดความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ป่าในธรรมชาติอีกด้วย

ปัจจุบันเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์จัดอยู่ในหลายอันดับ (order) มากกว่า 12 อันดับ ซึ่งอันดับที่พบมากที่สุดคือ Polyporales ซึ่งแบ่งตามวงศ์ (family) ได้อย่างน้อย 12 วงศ์ คือ Cystostereaceae, Fomitopsidaceae, Fragiliporiaceae, Ganodermataceae, Gelatoporiaceae, Meripilaceae, Meruliaceae, Phanerochaetaceae, Polyporaceae, Sparassidaceae, Steccherinaceae และ Xenamataceae ในงานวิจัยนี้สนใจเห็ดในวงศ์ Ganodermataceae และ Polyporaceae เนื่องจากมีความหลากหลายสูงและพบได้ง่าย ในประเทศไทยมีรายงานของเห็ดทั้ง 2 วงศ์นี้ หลายสปีชีส์ (species) ส่วนใหญ่จากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ Choeyklin และคณะ⁽⁸⁾ รายงานว่าเห็ดวงศ์ Ganodermataceae พบ 2 สกุล (genus) ได้แก่ *Amauroderma* และ *Ganoderma* ส่วนเห็ดวงศ์ Polyporaceae พบ 16 สกุล ได้แก่ *Abundisporus*, *Coriolopsis*, *Datronia*, *Echinochaete*, *Epithele*, *Flabelllophora*, *Fomitella*, *Grammothele*, *Megasporoporia*, *Pereniporia*, *Polyporus*, *Porogramme*, *Pseudolagarobasidium*, *Pycnoporus*, *Skeletocutis* และ *Trametes*⁽⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบเห็ดกลุ่มนี้ชนิดใหม่ๆ จากประเทศไทย อย่างต่อเนื่องอีกด้วย เช่น *Perenniporia bambusicola*, *Piptoporus roseovinaceus* และ *Polyporus thailandensis*^(8, 10, 11)



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ (a) *Abundisporus fuscopurpureus*, (b) *Coriolopsis glabrorigens*, (c) *Trametes hirsuta*, (d) *Polyporus dictyopus*, (e) *Microporus xanthopus* และ (f) *Irpeex lacteus*

ที่มา: (a) Franck AR. (1999). Retrieved June 5, 2024 from <https://www.gbif.org/occurrence/2984546499> (b) Biodiversity4all. (2024). Retrieved June 5, 2024 from <https://www.biodiversity4all.org/taxa/1369460-Coriolopsis-glabrorigens>. (c) Wikipedia. (2024). Retrieved June 5, 2024 from https://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_hirsuta (d) iNaturalist. (2024). Retrieved June 5, 2024 from <https://www.inaturalist.org/taxa/383789-Polyporus-dictyopus> (e) Gaye. (2011). Retrieved June 5, 2024 from <https://australianfungi.blogspot.com/2011/05/53-microporus-xanthopus.html> (f) Wikipedia. (2024). Retrieved June 5, 2024 from https://en.wikipedia.org/wiki/Irpex_lacteus

เห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ นอกจากเป็นผู้ย่อยสลายในธรรมชาติแล้ว บางชนิดสามารถรับประทานได้ บางชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่น เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Ganodermaceae พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ลดความเสื่อมของระบบประสาท (antineurodegenerative activity) และลดระดับน้ำตาล (antidiabetic activity) ในผู้ป่วยเบาหวาน⁽¹²⁾ เห็ด *G. applanatum* และ *G. camosum* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านมะเร็ง⁽¹³⁾ ส่วนเห็ด *Coriopsis aspera* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Polyporaceae มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิดข้ออักเสบ (anti-arthritis activity) ลดการอักเสบ (anti-inflammatory activity) และต้านมะเร็ง (anticancer activity) เป็นต้น⁽¹⁴⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากนักโดยเฉพาะการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอาง

2. บทบาทของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดราในด้านเวชสำอาง

เวชสำอาง (cosmeceutical products) คือ กลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมความงามที่มีสรรพคุณทางยา อาจเป็นสารสังเคราะห์ หรือสารที่ได้จากธรรมชาติ ปัจจุบันเวชสำอางเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยเสริมบุคลิกภาพ ความมั่นใจ และเสน่ห์ให้กับผู้บริโภค เวชสำอางจึงกลายเป็นที่นิยมทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ทำให้ตลาดของเวชสำอางทั่วโลกมีมูลค่าสูงถึง 378 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี ค.ศ. 2022 และคาดว่าจะมีมูลค่าสูงถึง 661.12 พันล้านดอลลาร์สหรัฐภายในปี ค.ศ. 2032 โดยมีอัตราการเติบโตอยู่ที่ 5.8% ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2023 ถึง ค.ศ. 2032⁽¹⁵⁾ สำหรับประเทศไทยรายงานจากสมาคมผู้ผลิตเวชสำอางระบุว่า ภาพรวมของตลาดเวชสำอางไทยในปี ค.ศ. 2023 มีทิศทางที่ขยายตัวอย่างต่อเนื่องซึ่งคาดว่าจะมีมูลค่ามากกว่า 2.46 แสนล้านบาท โดยมีอัตราการเติบโตสูงถึง 9.46% ต่อปี⁽¹⁾ เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคที่สูงทำให้ผู้ผลิตบางรายฉวยโอกาสใส่สารเคมีต้องห้าม เช่น ปรอท (mercury) สเตียรอยด์ (steroids) และ ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) ลงในเวชสำอาง เพื่อให้เห็นผลเร็วขึ้น แต่สารเคมีดังกล่าวมักส่งผลกระทบต่อผิวหนังและบริเวณที่ใช้ เช่น ปรอท ทำให้เกิดการแพ้ ผื่นแดง ผิวน้ำดำ เกิดฝ้าผื่น และ ผิวด่าง เป็นต้น นอกจากนี้ไฮโดรควิโนน ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) ได้ แต่เมื่อใช้ในปริมาณที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดอาการแสบร้อน ตุ่มแดง และภาวะผิวดำมากขึ้นในบริเวณที่ทา ดังนั้นสารเคมีอาจไม่ใช่ส่วนผสมในเวชสำอางที่ดีที่สุดเนื่องจากมีผลข้างเคียงมาก และส่งผลกระทบต่อผิวหนังโดยตรง

ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการคิดค้น วิจัย หาส่วนผสมของเวชสำอางที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น โดยหลีกเลี่ยงการผสมสารเคมีลงในเวชสำอาง สารสกัดจากธรรมชาติจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ทดแทนสารเคมี แม้ว่าสารสกัดจากธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้ในเวชสำอางจะมาจากพืชและสัตว์ แต่เห็ดราที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งใหม่ของส่วนผสมเวชสำอาง

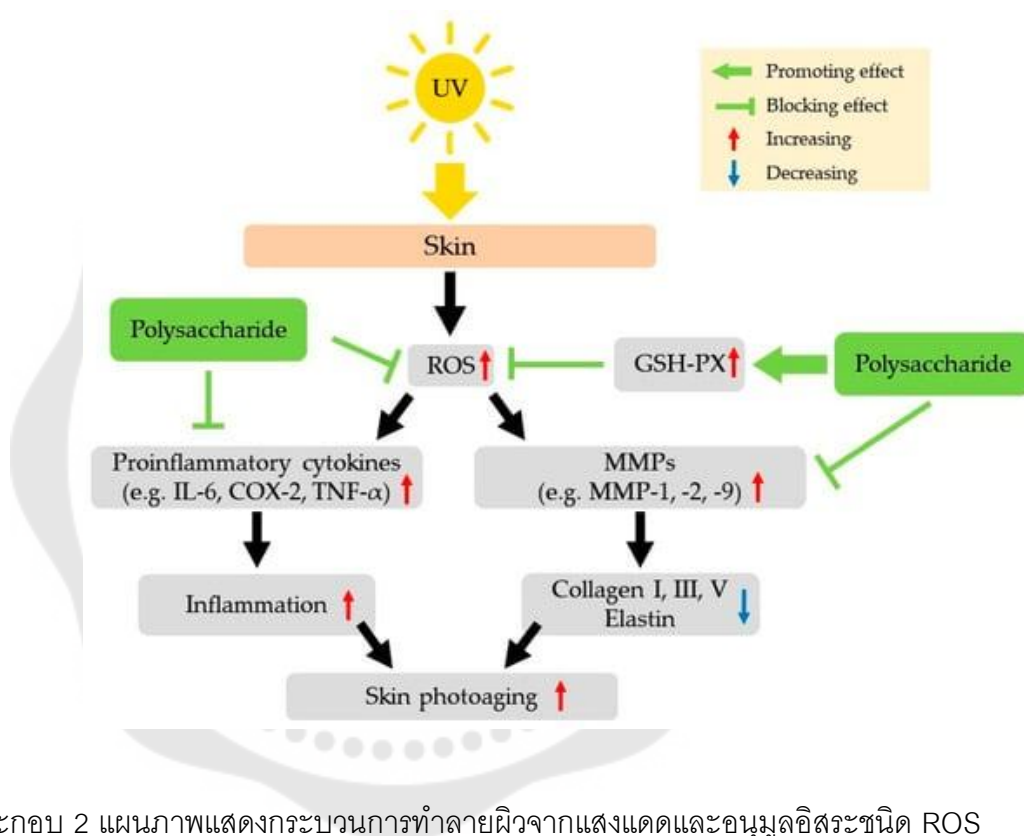
จากธรรมชาติที่มีแนวโน้มที่ดีเห็ดราที่มีสรรพคุณทางยา มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมทั้ง สารพอลิแซ็กคาไรด์ และสารทุติยภูมิ ซึ่งพบว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ด้านการเจริญของเนื้อออก กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และด้านการอักเสบ^(16, 17) ตัวอย่างการนำสารสกัดจาก เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) มาใช้ในเวชสำอางชะลอวัย (anti-ageing) การนำสารพอลิแซ็กคาไรด์ จากเห็ด *Tremella* sp. มาใช้เป็นส่วนผสมของสารเพิ่มความชุ่มชื้น (moisturizing agents) การนำสาร สกัดจากเส้นใยเห็ด *Tricholoma matsutake* มาเป็นส่วนผสมในเวชสำอางเพื่อลดริ้วรอย ลดอาการ อักเสบ และสารสกัดจากเห็ด *Agaricus bisporus*, *A. hortensis*, *Ganoderma* spp. และ *Phellinus baumii* ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างเม็ดสีเมลานิน ส่งผล ให้เซลล์ผิวสร้างเม็ดสีเมลานินลดลง⁽³⁾ นอกจากนี้รายงานในปี ค.ศ. 2019 พบว่าสารสกัดจาก *G. lucidum* มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเสริมสร้างเกราะป้องกันชั้นผิวหนัง ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase) และอีลาสเทส (anti-elastase) ช่วยฟื้นฟูความยืดหยุ่นของผิว และความต้านทานแรงดึงได้อีกด้วย⁽¹²⁾ รายงานในปี ค.ศ. 2021 พบว่าสารสกัดจากเห็ด *Trametes versicolor* มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ⁽¹⁸⁾ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่มี ความสำคัญสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเวชสำอางได้

นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เวชสำอางชั้นนำหลายแบรนด์ได้นำสารสกัดจากเห็ดรามาใช้ เช่น “Aveeno Positively Ageless” ของจอห์นสันแอนด์จอห์นสัน ซึ่งใช้สารสกัดจากเห็ด *L. edodes* และ *G. lucidum* พิสูจน์แล้วว่าช่วยเร่งการผลิตเซลล์ผิวใหม่ตามธรรมชาติ ลดเลือนริ้วรอย และความเหี่ยวย่น ในขณะที่ ผลิตภัณฑ์ “Nano Works Pureology” สำหรับสกินแคร์และเส้นผม มีส่วนผสมของเห็ด *L. edodes* และ *Mucor miehei* โดยมีคุณสมบัติต่อต้านริ้วรอย บำรุงผม และต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ “Mega-Mushroom” เป็นการรวมกันของสารสกัดเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ *Hypsizygus ulmarium*, *Cordyceps* sp. และ *G. lucidum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี⁽³⁾ บทบาทของสารสกัดจาก เห็ดราในด้านเวชสำอางสามารถแบ่งตามหน้าที่หลักๆ ได้ดังนี้ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการอักเสบ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นต้น

2.1 การต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือโมเลกุลของสารที่ขาดคู่อิเล็กตรอนทำให้ไม่เสถียร⁽¹⁹⁾ โมเลกุลของสารเหล่านี้จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงโดยการดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ โครงสร้างเสถียร อนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญต่อความเสื่อมของเซลล์มากที่สุด ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไฮดรอกซิล ไอออน (OH) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นต้น ในร่างกายมนุษย์ ROS เป็นผลพลอยได้จากการเผาผลาญแบบใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย เมื่อร่างกายผลิตในปริมาณที่น้อยจะเป็นประโยชน์กับเซลล์ แต่ในปริมาณที่มากเกินไปจะทำลายสารโมเลกุล

ขนาดใหญ่ในเซลล์ เช่น สารพันธุกรรม โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ ขาดสมภาวะสมดุล แรงกระตุ้นการชรา เป็นต้น⁽²⁰⁾ การสัมผัสกับรังสียูวีจากแสงแดดสามารถกระตุ้นให้เกิด ROS เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การทำลายโครงสร้างเซลล์ และการอักเสบ นอกจากนี้ปริมาณของ ROS ที่มากเกินไปจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ส่งผลให้เกิดการผลิตคอลลาเจนและอีลาสตินลดลง แรงให้เกิดความชราของเซลล์ผิว รวมทั้งกระตุ้นการผลิตสาร cytokines ทำให้เกิดการอักเสบอีกด้วย (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 แผนภาพแสดงกระบวนการทำลายผิวจากแสงแดดและอนุมูลอิสระชนิด ROS

ที่มา: Yueying Y, Sukaboon R. Skin health promoting effects of natural polysaccharides and their potential application on the cosmetic Industry. Polysaccharides. 2022;3(4):818-830.

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่โมเลกุลมีความเสถียร สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร แล้วทำให้โมเลกุลนั้นเป็นกลางได้ ซึ่งจะลดความสามารถในการเป็นอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระที่ดีมักมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ⁽²¹⁾ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งชนิดที่ร่างกายสามารถสร้างเองได้ตามธรรมชาติ เช่น กลูตาไธโอน (glutathione) ยูบิควินอล (ubiquinol) และกรดยูริก (uric acid) และชนิดที่ร่างกายไม่สามารถสร้าง

เองได้ เช่น วิตามินอี (α -tocopherol) วิตามินซี (ascorbic acid) และเบต้าแคโรทีน (β -carotene) เป็นต้น⁽²²⁾ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดหลายชนิดที่เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจาก ROS ได้ ดังนั้นจึงสามารถลดการอักเสบ และลดขั้นตอนที่ชักนำให้เกิดความเสื่อมของผิวได้ แสดงในภาพประกอบ 2 จากงานวิจัยของ Barbosa และคณะ (2020) พบว่าสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *P. ostreatus* มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการทำลายของเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จากสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)⁽²³⁾ สารพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Phellinus igniarius* มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอน เพอออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง ROS ได้ จึงลดการอักเสบและความเสื่อมของผิวได้อีกด้วย⁽²⁴⁾ สำหรับวิธีในการวัดประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น ปฏิกิริยาของ 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities (DPPH assay), ปฏิกิริยาของ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activities (ABTS assay) และ ปฏิกิริยากับสาร ferrous ion (ferrous ion chelating assay) radical scavenging activities (FIC assay) เป็นต้น^(25, 26)

2.1.1 DPPH assay

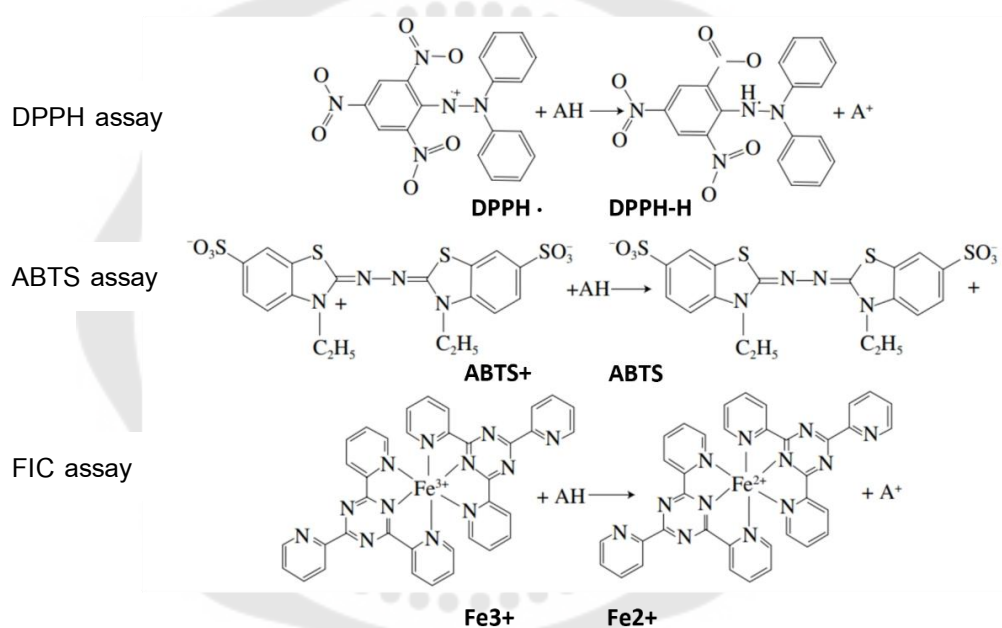
วิธีนี้เป็นวิธีพื้นฐานที่ได้รับความนิยมสูงในการวัดประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนกับ สารอนุมูลอิสระ DPPH (สีม่วง) ให้เปลี่ยนไปเป็น DPPH-H (สีเหลือง) ดังภาพประกอบ 3 สามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การวัดด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับใช้วัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีขนาดเล็กและมีคุณสมบัติ lipophilic ตัวอย่างเช่น quercetins, resveratrols และ anthocyanins เป็นต้น และมีรายงานว่าวิธีนี้เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของฤทธิ์ทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามควรใช้วิธีอื่นร่วมวิเคราะห์ด้วยเพื่อการยืนยันผล

2.1.2 ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีแรกๆ ที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สาร ABTS ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) แล้วเปลี่ยนเป็นสารอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ (สีน้ำเงินเข้มเขียว) สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนกลับเป็นสาร ABTS (ไม่มีสี) (ภาพประกอบ 3) การวัดด้วยวิธีนี้เหมาะสำหรับใช้วัดสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติทั้ง lipophilic หรือ hydrophilic เช่นเดียวกับวิธี DPPH assay คือวิธีนี้เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของฤทธิ์ทางชีวภาพ และควรวัดร่วมกับวิธีอื่นเพื่อยืนยันผล

2.1.3 FIC assay

วิธีนี้เป็นปฏิกิริยาระหว่างสาร ferrozine-feric complex $[\text{Fe}^{3+}\text{-FZ}]^{3+}$ กับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนแล้วเปลี่ยนจากสาร $[\text{Fe}^{3+}\text{-FZ}]^{3+}$ เป็นสาร $[\text{Fe}^{2+}\text{-FZ}]^{2+}$ (สีม่วง) (ภาพประกอบ 3) ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามการพบว่าการเปลี่ยนจาก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} คุณสมบัติไม่ได้เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางชีวภาพ เนื่องจากอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) โดยอาศัยหลักการ ในสภาวะปกติเฟอริก (Fe^{3+}) จะจับกับเฟอโรซีน (ferrozine) ทำให้กลายเป็นสีม่วง แต่ถ้ามีสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระจะให้อิเล็กตรอนกับเฟอริก ทำให้เฟอริกไม่สามารถจับกับเฟอโรซีนได้ จึงไม่เกิดเป็นสีม่วง โดยวิธีนี้จะวัดผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น ถ้าหากตัวอย่างมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูง ก็จะไม่เกิดสีม่วง ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ควรใช้วิธีอื่นร่วมวิเคราะห์ด้วย



ภาพประกอบ 3 แผนภาพปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FIC assay

ที่มา: Lang Y, Gao N, Zang Z, Meng X, Lin Y, Yang S, et al. Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. J. Future Foods. 2024;4(3):193-204.

ตัวอย่างการศึกษาด้านอนุมูลอิสระจากเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ส่วนใหญ่ศึกษาในเห็ดหลินจือ หรือ *G. lucidum*, *Trametes gilbosa*, *T. hirsuta* และ *T. versicolor* เป็นต้น ซึ่งมีการศึกษารสชาติทั้งจากดอกเห็ด เส้นใย และน้ำเลี้ยงเชื้อ ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดียิ่งขึ้นแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์

สปีชีส์	ส่วนที่สกัด	วิธีการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์	อ้างอิง
<i>Ganoderma lucidum</i>	ดอกเห็ดสกัดด้วยเมทานอล	DPPH assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 51.3 \pm 1.04 \mu\text{Mol TE/g}$	(27)
		ABTS assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 81.26 \pm 1.10 \mu\text{Mol TE/g}$	(27)
		FRAP assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 49.87 \pm 1.58 \mu\text{Mol TE/g}$ TE = trolox equivalent	(27)
<i>Trametes gibbosa</i>	ดอกเห็ด และเส้นใยบริสุทธิ์ สกัดด้วยเอทานอล	ABTS assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 14.67 \pm 0.93 \text{ mg/mL}$	(28)
			- จากเส้นใย $IC_{50} = 31.43 \pm 0.83 \text{ mg/mL}$	
		FRAP assay	Equivalent of reduced Fe^{2+} - จากดอกเห็ด $IC_{50} = 0.015 \pm 0.001 \text{ mM}$ - จากเส้นใย $IC_{50} = 0.011 \pm 0.001 \text{ mM}$	(28)
		Total phenol compound	- จากดอกเห็ด = $18.21 \pm 0.30 \mu\text{g GAE mg/g extract}$ - จากเส้นใย = $14.79 \pm 0.57 \mu\text{g GAE mg/g extract}$ GAE = gallic acid equivalent	(28)
<i>Trametes hirsuta</i>	ดอกเห็ด และเส้นใยบริสุทธิ์ สกัดด้วยเอทานอล	ABTS assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 18.33 \pm 1.41 \text{ mg/mL}$	(28)
			- จากเส้นใย $IC_{50} = 27.50 \pm 0.42 \text{ mg/mL}$	
		Total phenol compound	- จากดอกเห็ด = $8.95 \pm 0.30 \mu\text{g GAE mg/g extract}$ - จากเส้นใย = $12.41 \pm 0.24 \mu\text{g GAE mg/g extract}$	(28)
<i>Trametes versicolor</i>	ดอกเห็ด และเส้นใยบริสุทธิ์ สกัดด้วยเอทานอล	DPPH assay	- จากดอกเห็ด $IC_{50} = 8.46 \pm 0.49 \text{ mg/mL}$	(28)
			- จากเส้นใย $IC_{50} = 20.00 \pm 1.57 \text{ mg/mL}$	
		ABTS assay	Equivalent of reduced Fe^{2+} - จากดอกเห็ด $IC_{50} = 0.037 \pm 0.007 \text{ mM}$ - จากเส้นใย $IC_{50} = 0.025 \pm 0.00 \text{ mM}$	(28)

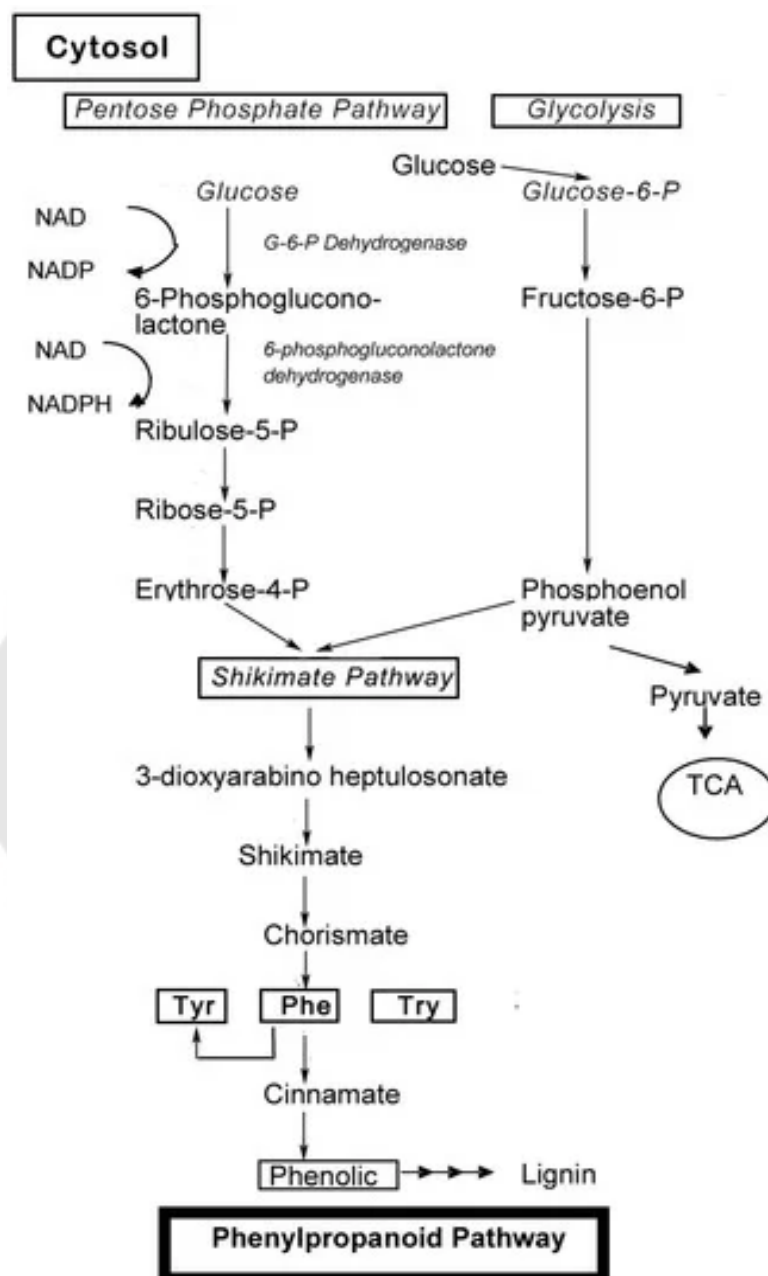
สปีชีส์	ส่วนที่สกัด	วิธีการวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์	อ้างอิง
		Total phenol compound	- จากดอกเห็ด = 14.18 ± 0.30 μg GAE mg/g extract - จากเส้นใย = 14.51 ± 0.27 μg GAE mg/g extract	(28)
<i>Trametes versicolor</i>	น้ำเลี้ยงเชื้อสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล	DPPH assay	% Radical scavenging assays - สารสกัดเมทานอล อยู่ในช่วง 10.97-62.80 % - สารสกัดเอทานอล อยู่ในช่วง 22.42-64.84 %	(29)

2.2 สารประกอบฟีนอล

สารประกอบฟีนอล (phenol compounds) จัดเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกและมีหมู่ไฮดรอกซิลประกอบอยู่ในโครงสร้าง⁽³⁰⁾ สำหรับกลไกการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลนั้นถูกสร้างจากกระบวนการฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid metabolization)⁽³¹⁾ โดยเริ่มต้นจะใช้กลูโคสผ่านกระบวนการเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) และกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) เพื่อเปลี่ยนจากกลูโคสเป็น อิริโทรส-4-ฟอสเฟต (erythrose-4-phosphate) และฟอสโฟอินโนลไพริเวต (phosphoenol pyruvate) ตามลำดับ จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการชิคิมิก (shikimic acid pathway) เพื่อสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก(ภาพประกอบ 4) สารประกอบฟีนอลสามารถแบ่งตามขนาดโครงสร้างได้หลายแบบ ยกตัวอย่างเช่น กรดแกลลิก (gallic acid), ฟลาโวนอยด์ (flavonoid), กรดเอลลาจิก (ellagic acid) และ เควอซิติน (quercetin)⁽³²⁾(ภาพประกอบ 5) เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระเพื่อทำให้โครงสร้างมีความเสถียร (ภาพประกอบ 6)⁽³³⁾ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลมีความสามารถเป็นตัวจับโลหะหนัก เช่น Fe^{+3} ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้ส่งผลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โดยการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลนิยมเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งปริมาณสารที่พบจะแสดงในหน่วย GAE/g ของสารสกัด การศึกษาสารประกอบฟีนอลมักศึกษาควบคู่ไปพร้อมกับการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาสารสกัดเอทานอลของเห็ด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *G. lucidum* และ *Ganoderma tropicum* เพื่อศึกษาหาปริมาณฟีนอล และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดของ *G. lucidum* พบสารประกอบฟีนอลมากที่สุด เท่ากับ 81.34 ± 0.68 GAE/g นอกจากนี้พบว่ามีความสัมพันธ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าค่า IC_{50} ของ *G. lucidum* มีค่าเท่ากับ 40.44 ± 2.09 $\mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตาม *G. lucidum* แสดงคุณสมบัติด้านการอักเสบ โดยสามารถ

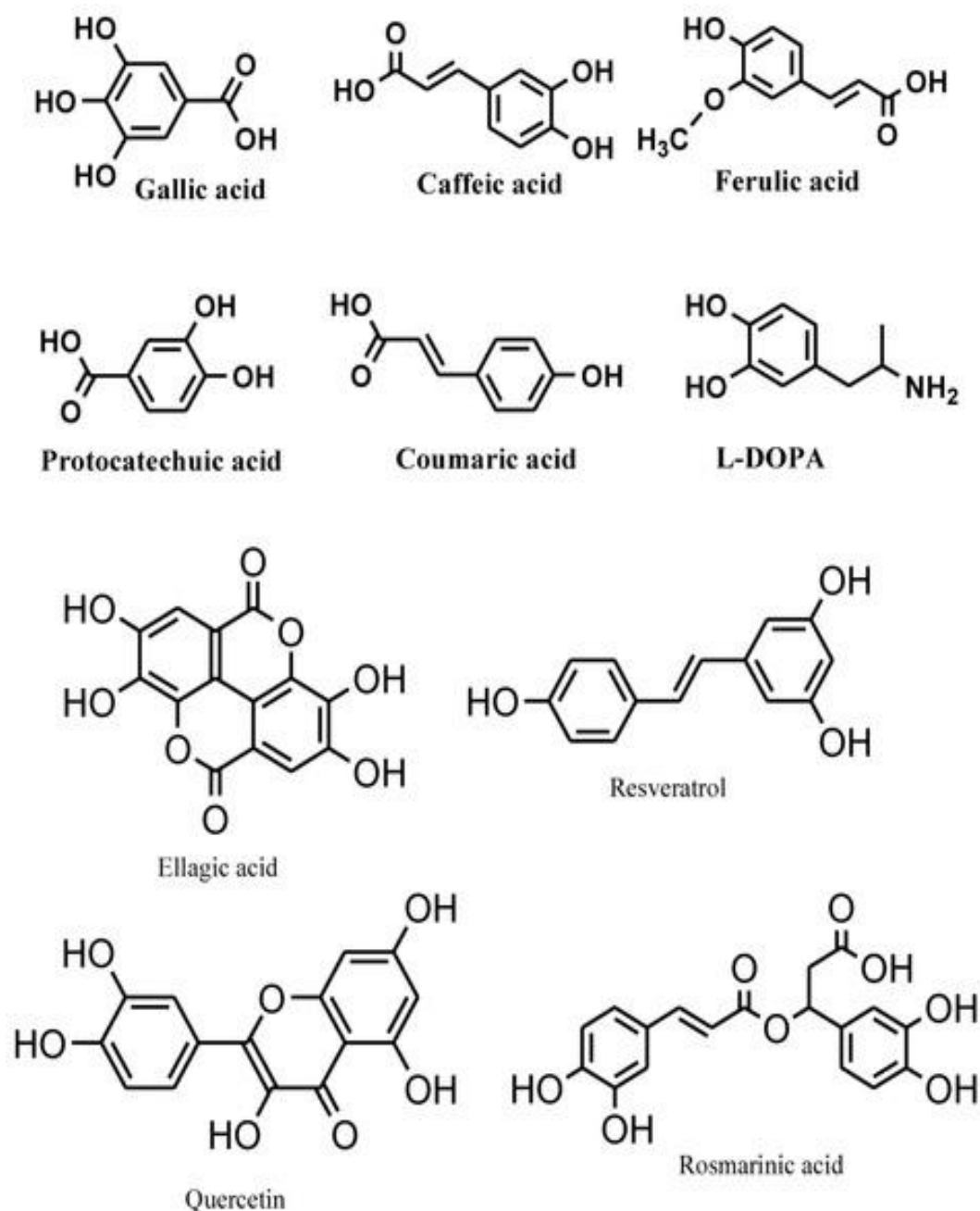
ยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ได้ 50% ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ $137.89 \pm 1.85 \mu\text{g/mL}$ ⁽³⁴⁾ แต่ในบางกรณีปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดที่มีมาก อาจจะไม่ได้นำแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเพียงอย่างเดียว เนื่องจากสารสกัดนั้นอาจจะมีคุณสมบัติอื่น นอกเหนือจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีรายงานระบุว่าสารประกอบฟีนอลมีคุณสมบัติในหลายด้าน เช่น ด้านวิวัฒนาการ ด้านการอักเสบ รวมถึงต้านอนุมูลอิสระ⁽³²⁾





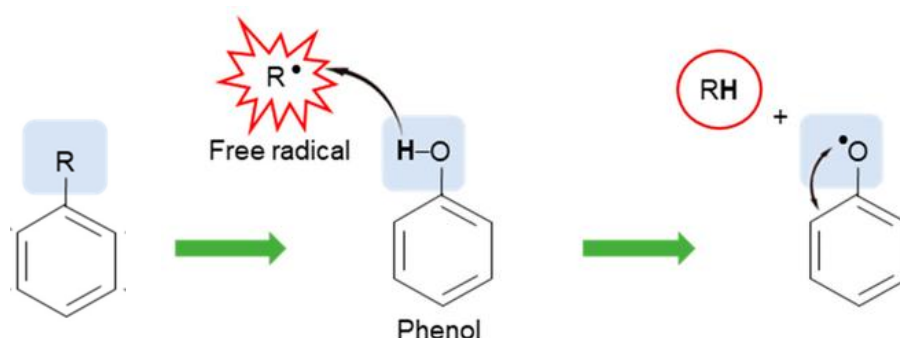
ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการสังเคราะห์ฟีนอล

ที่มา: Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21(10):1374.



ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างโครงสร้างของสารประกอบฟีนอล

ที่มา: Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21(10):1374.

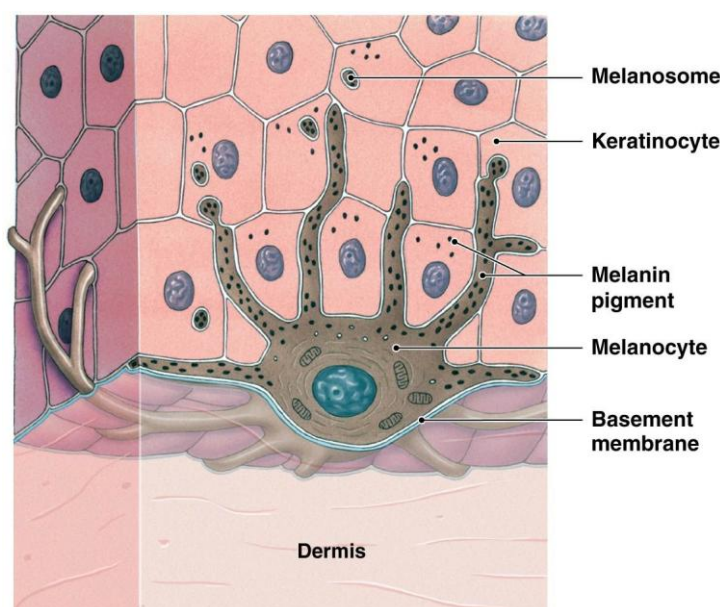


ภาพประกอบ 6 กลไกของสารประกอบฟีนอลในการต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Redox homeostasis and natural dietary compounds: focusing on antioxidants of rice (*Oryza sativa* L.). 2018;10(1065):1374.

2.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผิวหนัง (skin) คือ อวัยวะที่สำคัญของร่างกาย ช่วยปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี และรังสีอัลตราไวโอเลตหรือยูวี (ultraviolet)⁽³⁴⁾ ซึ่งรังสียูวีเป็นรูปแบบหนึ่งของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าแสงที่ตาสามารถมองเห็นได้ และมีความยาวคลื่นมากกว่ารังสีเอกซ์ (X-rays)⁽³⁵⁾ รังสียูวีสามารถพบได้จากแสงของดวงอาทิตย์และแสงทั่วไป โดยประมาณ 10% ของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าทั้งหมดที่ปล่อยออกมาจากดวงอาทิตย์ มีผลกระทบต่อผิวหนังทำให้เกิดความเสียหายเกิดความชรา โดยร่างกายมีกลไกการตอบสนองต่อปฏิกิริยาดังกล่าวโดยการผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin)^(34, 35) ซึ่งเป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่า เมลาโนไซต์ (melanocyte) (ภาพประกอบ 7) อยู่ในชั้นหนังกำพร้า (epidermis) นอกจากเมลาโนไซต์แล้วยังพบเซลล์ผิวหนังชนิดอื่น เช่น เบซอลเซลล์ (basal cells) และเคราติโนไซต์ (keratinocytes cells) ซึ่งเซลล์เหล่านี้ทำงานร่วมกันในการปกป้องผิวจากแสงแดด สารพิษ มลภาวะ และการสูญเสียน้ำในมนุษย์⁽³⁶⁾ เมลานินแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งมีสีน้ำตาลถึงสีดำ และ พีโอเมลานิน (pheomelanin) ซึ่งมีสีเหลืองถึงสีแดง⁽³⁷⁾

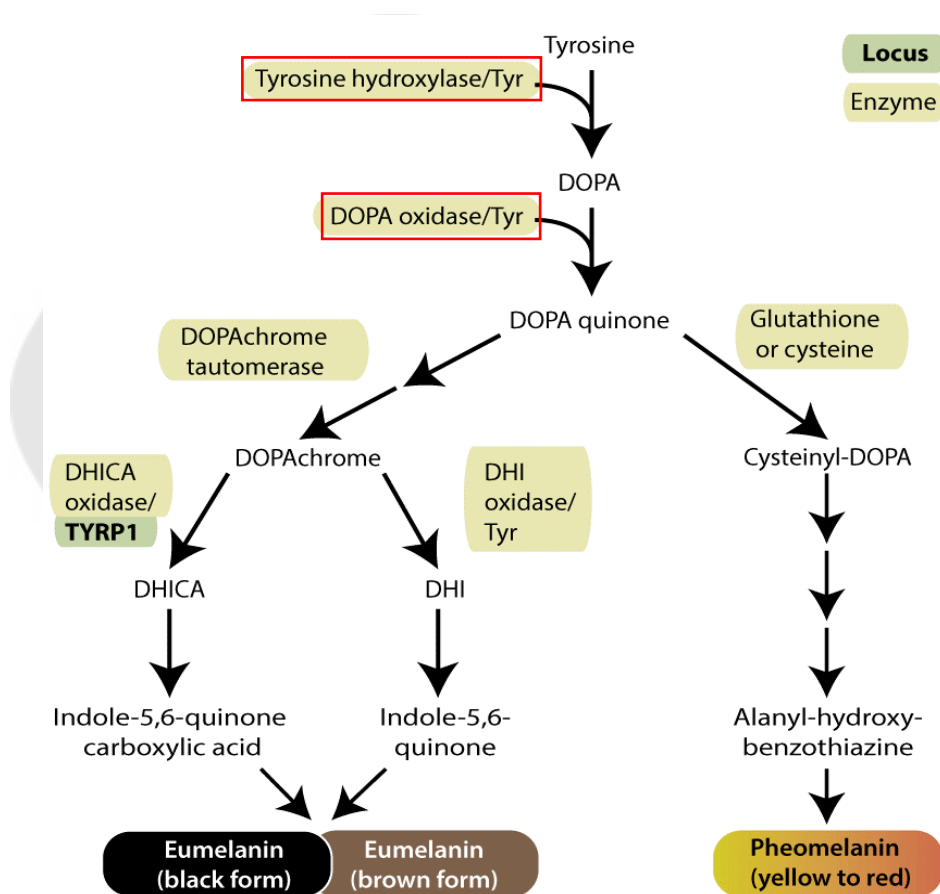


ภาพประกอบ 7 แผนภาพโครงสร้างเซลล์ผิวหนังกำพร้าที่ประกอบด้วยเซลล์เมลานोไซต์ที่สร้างเม็ดสีเมลานินและเซลล์เคราติโนไซต์

ที่มา: Quizlet. (2024). Retrieved June 19, 2024 from <https://quizlet.com/569700418/melanocyte-diagram>

สำหรับกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis mechanisms) ชนิดยูเมลานินและฟีโอ เมลานิน เริ่มต้นด้วยสารชนิดเดียวกันคือ ไทโรซีน (tyrosine) จะถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีฟีนิลอลานีน (dihydroxyphenylalanine; DOPA) ด้วยเอนไซม์ไทโรซีนไฮดรอกซีเลส (tyrosine hydroxylase) หรือ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) จากนั้นเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเปลี่ยน DOPA เป็นโดปาคิวโนน (DOPA quinone) แล้วเข้าสู่กระบวนการต่างๆ เพื่อสร้างยูเมลานินหรือฟีโอเมลานิน⁽³⁸⁾ (ภาพประกอบ 8) ในกระบวนการผลิตเมลานินนั้นเอนไซม์ที่สำคัญคือ ไทโรซิเนส ถ้าร่างกายผลิตเมลานินมากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อผิวหนังทำให้มีสีผิวคล้ำ ไม่สม่ำเสมอ เช่น กระ และ ฝ้า ดังนั้นถ้าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ อาจทำให้การสร้างเม็ดสีเมลานินลดลง ปัจจุบันเวชสำอางที่มีสรรพคุณในการทำให้ผิวกระจ่างใส ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคอย่างมาก ซึ่งหลายผลิตภัณฑ์มีการเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสร่วมด้วย จากงานวิจัยในปี ค.ศ. 2020 ของ Razak และคณะได้ศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากดอกเห็ดหลายชนิด ได้แก่ *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *Auricularia polytricha* และ *Schizophyllum commune* ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (anti-hyaluronidase) และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า *S. commune* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดเท่ากับ 98.15% เมื่อเทียบกับกรดโคจิก (koji) ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมเชื้อบวม รองลงมาคือสารสกัด

จาก *G. lucidum* มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ปานกลาง เท่ากับ 30.56 – 45.37% ในขณะที่สารสกัดจาก *A. polytricha* และ *P. ostreatus* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว⁽³⁹⁾ นอกจากนี้สารสกัดจากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ด *Ganoderma weberianum* ที่ปริมาณ 25 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินได้⁽⁴⁰⁾ และสารสกัดของเห็ด *T. versicolor* พบว่าที่ความเข้มข้น 1,239 mg/mL สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เท่ากับ 50%⁽⁴¹⁾ ทั้งนี้สารสกัดจากเห็ดจึงมีแนวโน้มที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้



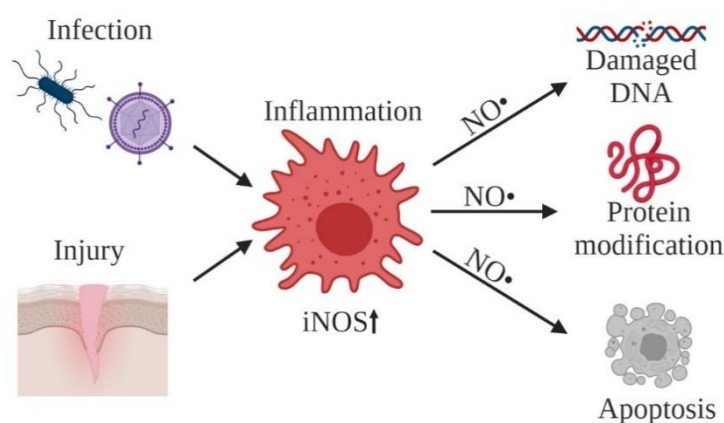
ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนการสร้างเม็ดสีเมลานินของเซลล์เมลานोไซต์

ที่มา: Biology. (2019). Retrieved March 15, 2024 from

<https://biology.stackexchange.com/questions/42944/how-to-increase-pheomelanin-production>

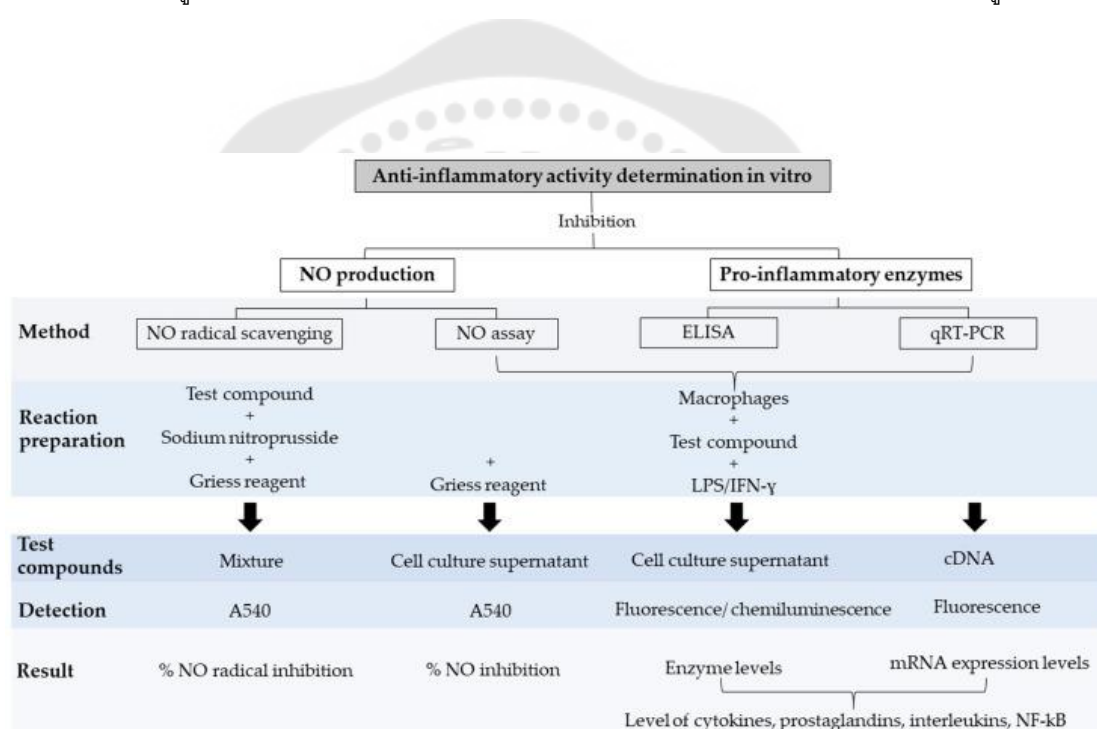
2.4 การต้านการอักเสบ

การอักเสบ (inflammation) คือการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งกระตุ้นภายนอกที่เป็นอันตราย เช่น เชื้อโรค สารพิษ หรือสารระคายเคือง โดยมีอาการพื้นฐานคือ ปวด ร้อน บวม แดง กลไกนี้ช่วยปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดความเสียหาย รวมถึงการกระตุ้นแมคโครฟาจ (macrophage) ด้วยสารตัวกลางต่าง ๆ (mediators) เช่น lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ) และ nuclear factor kappa B (NF- κ B) โดยสามารถกระตุ้นผ่านเอนไซม์ cyclooxygenase (COX), เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) และการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6) เป็นต้น ซึ่งสารตัวกลางเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบทั้งสิ้น โดยเฉพาะไนตริกออกไซด์ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการขยายหลอดเลือด การควบคุมความดันเลือด สารสื่อประสาท และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไนตริกออกไซด์ถูกสร้างได้จากเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งแมคโครฟาจ โดยมีสารตั้งต้นคือ แอล-อาร์จินีน (L-arginine) โดยใช้เอนไซม์หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible NO synthase; iNOS) เมื่อเกิดกระบวนการอักเสบจะเกิดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในปริมาณที่สูงกว่าปกติ⁽⁴²⁾ ซึ่งไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกิจกรรมการทำงาน การเจริญเติบโต และการตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้ง แมคโครฟาจ , T lymphocytes, antigen-presenting cells, mast cells, neutrophils และ natural killer cells เป็นต้น โดยการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน และนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด⁽⁴³⁾ (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 แผนภาพบทบาทของไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากแมคโครฟาจในการทำลายเซลล์
 ที่มา: Chemistry analysis: Microfluidic detection of intracellular nitric oxide levels. (2020). Retrieved March 15, 2024 from
<https://www.openaccessgovernment.org/chemistry-analysis-microfluidic-detection-of-intracellular-nitric-oxide-levels/84838/>

ในการทดสอบสารต้านการอักเสบมีหลายวิธี เนื่องจาก ไนตริกออกไซด์ที่สร้างขึ้นจำนวนมากสามารถอธิบายถึงความเป็นพิษและโอกาสในการเกิดกระบวนการอักเสบได้ ดังนั้นการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ หรือลดปริมาณไนตริกออกไซด์ ทั้งแบบทางตรงจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือแบบทางอ้อมโดยการทำปฏิกิริยาเคมีของ Griess assay โดยวิธีนี้ว่า NO radical scavenging ซึ่งสามารถใช้ประเมินการต้านการอักเสบได้ (ภาพประกอบ 10) ในขณะที่วิธีการทดสอบการต้านการอักเสบด้วยวิธีอื่น เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) วัดปริมาณการเพิ่มขึ้นของสาร cytokines, prostaglandins และ interleukins ซึ่งถูกผลิตขึ้นในกระบวนการอักเสบ เป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพแต่มีค่าใช้จ่ายที่สูง



ภาพประกอบ 10 แผนภาพแสดงวิธีต่าง ๆ ในการวัดการต้านการอักเสบในระดับห้องปฏิบัติการ

ที่มา: Ostria C, Pacheco SE, Pastor R, Moya J, Ramos A, Polit C. Evaluation of biological activity of natural compounds: current trends and methods. *Molecules*. 2022;27(14):4490.

สารด้านการอักเสบจากธรรมชาติ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), แอลคาลอยด์ (alkaloids), ซาโปนิน (saponins), คูมาริน (coumarins), แอนทราควิโนน (anthraquinones), แซ็กคาไรด์ (saccharides), และ กลูโคซิโนเลต (glucosinolates) นอกจากนี้สารสกัดจากเห็ด *T. versicolor* พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้น 100-2,000 µg/mL สามารถยับยั้งได้เท่ากับ 24.7-56.37 % เมื่อทดสอบด้วยวิธี NO scavenging assay⁽⁴⁴⁾ ต่อมาในปี ค.ศ. 2022 Aursuwanna และคณะ ศึกษาสารสกัดโปรตีนจากเห็ด *Ganoderma lingzhi* ในการด้านการอักเสบด้วยวิธี NO scavenging assay พบว่าสามารถด้านการอักเสบได้ดีเมื่อใช้สารสกัดเท่ากับ 2.5% (w/v)⁽⁴⁵⁾

3. ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดและการวิเคราะห์ชนิดของสาร

ในปัจจุบันเวชสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากธรรมชาติได้รับความนิยมอย่างมาก ซึ่งส่วนประกอบของเวชสำอางโดยทั่วไป ประกอบด้วย 1) สารออกฤทธิ์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ที่ใช้ในการแก้ปัญหาเฉพาะ เช่น สารลดริ้วรอย สารทำให้ผิวกระจ่างใส และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น 2) สารพื้นฐาน ได้แก่ น้ำ สารลดแรงตึงผิว สีย้อม 3) ตัวทำละลาย มีหน้าที่ละลายส่วนผสมทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบที่สำคัญของแบรนด์สินค้า คือสารออกฤทธิ์ เนื่องจากสินค้าแต่ละประเภทจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน สารออกฤทธิ์จากเห็ดราที่นำมาใช้ในเวชสำอางปัจจุบันมีหลายผลิตภัณฑ์ เช่น ครีม โลชั่น และ เซรั่ม เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางอื่นๆ มากมาย เช่น สารสกัดจากเห็ด *L. edodes*, *Grifola frondose*, *G. lucidum*, *Wolfiporia extensa*, *Cordyceps sinensis* และ *Tremella* spp. นิยมใช้เป็นส่วนผสมของเวชสำอางในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี ส่วนสารสกัดจากเห็ด *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *Hypsizygus ulmarius*, *Fomes fomentarius* นิยมใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอาง แถบประเทศตะวันตก เป็นต้น ซึ่งสารสกัดจากเห็ดที่ใช้มีทั้งจากดอกเห็ด จากเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้สารออกฤทธิ์หลักที่แตกต่างกันขึ้นกับวิธี ขั้นตอน และตัวทำละลาย ที่ใช้ในการสกัด ตัวอย่างกลุ่มสารออกฤทธิ์และชนิดของเห็ดที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอางแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างกลุ่มสารออกฤทธิ์จากเห็ดราและฤทธิ์ทางชีวภาพ

กลุ่มของสาร	ชนิดของเห็ดรา	ฤทธิ์ทางชีวภาพ
Alkaloids	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Coprinus comatus</i> ,	ต้านอนุมูลอิสระต้าน
	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Volvareilla volvacea</i>	การอักเสบ ต้าน
		จุลินทรีย์
Flavonoids	<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lentinus edodes</i> ,	ต้านอนุมูลอิสระ ต้าน
	<i>Macrolepiota mastoidea</i> , <i>Russula</i>	การอักเสบ ต้าน
	<i>griseocarnosa</i>	จุลินทรีย์
Glycosides	<i>Flammulina velutipes</i> , <i>Grifola frondosa</i> ,	ต้านอนุมูลอิสระ
	<i>Hypsizigus mamoreus</i> , <i>L. edodes</i> ,	ต้านการอักเสบ
	<i>Pholiota nameko</i>	
Phenols และ polyphenols	<i>A. bisporus</i> , <i>L. edodes</i> , <i>Phellinus linteus</i> ,	ต้านอนุมูลอิสระ
	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Sparassis crispa</i> ,	ต้านการอักเสบ
	<i>Tricholoma equestre</i>	ต้านจุลินทรีย์
Protein และ amino acids	<i>A. bisporus</i> , <i>Coprinus comatus</i> , <i>L.</i>	ต้านการอักเสบ
	<i>edodes</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>Sparassis crispa</i> ,	ต้านจุลินทรีย์
	<i>V. volvacea</i>	
Saponins	<i>A. bisporus</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>P.</i>	ต้านอนุมูลอิสระ
	<i>ostreatus</i> , <i>Termitomyces albuminosus</i> ,	
	<i>Wolfiporia cocos</i>	
Steroids	<i>Agaricus subrufescens</i> , <i>Marasmius</i>	ต้านการอักเสบ
	<i>oreades</i> , <i>Panellus serotinus</i> , <i>Pleurotus</i>	
	<i>eryngii</i> , <i>Stropharia rugosoannulata</i>	
Tannins	<i>A. bisporus</i> , <i>L. edodes</i> , <i>Lentinus sajor-</i>	ต้านอนุมูลอิสระ
	<i>caju</i> , <i>V. volvacea</i>	ต้านจุลินทรีย์
Triterpenoids	<i>Ganoderma colossum</i> , <i>Lepista nuda</i> ,	ต้านการอักเสบ
	<i>Naematoloma sublateralitium</i> , <i>Panellus</i>	ต้านจุลินทรีย์
	<i>serotinus</i> , <i>Scleroderma citrinum</i> ,	
	<i>Tricholoma matsutake</i>	

ที่มา: Wu Y, Choi MH, Li J, Yang H, Shin HJ. Mushroom cosmetics: the present and future. *Cosmetics*. 2016;3(3):22.

3.1 การวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

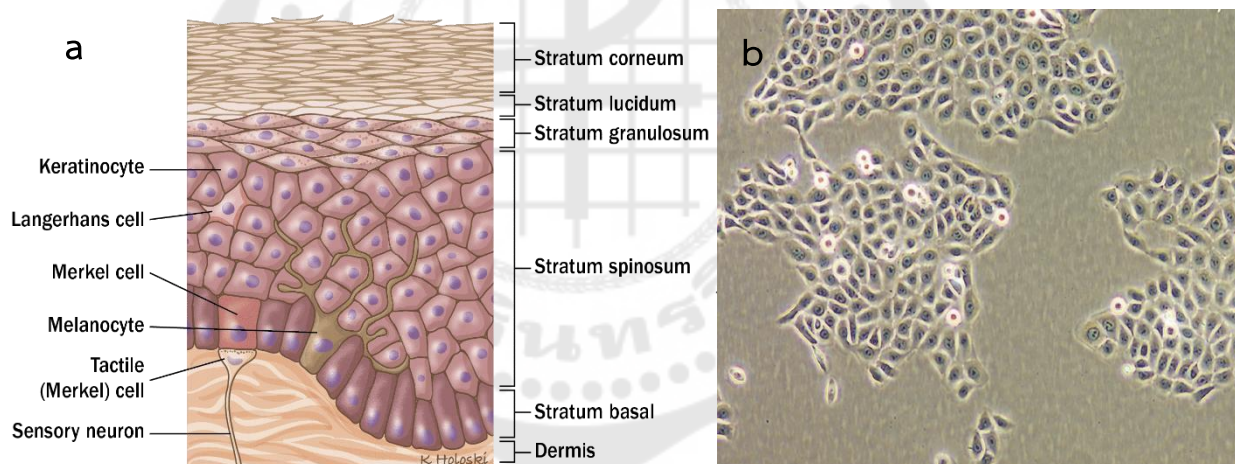
ปัจจุบันการวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทั้งหมดด้วยเทคโนโลยีเมแทบอโลมิกส์ (metabolomics) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) และ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR spectroscopy) ซึ่งแต่ละวิธีมีวัตถุประสงค์การใช้แตกต่างกัน รวมทั้งชนิดของกลุ่มสารที่ศึกษาต่างกัน ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค LC-MS ในการวิเคราะห์ชนิดสารทั้งหมด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง (high sensitivity) สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้ มีความจำเพาะสูง (specificity) สามารถวิเคราะห์ชนิดของสารได้หลากหลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถระบุปริมาณสารที่พบในตัวอย่างได้ ในขณะที่วิธี GC-MS เน้นการวิเคราะห์สารระเหย ส่วนวิธี NMR spectroscopy แม้จะเตรียมตัวอย่างง่ายแต่มีความไวต่ำและวิเคราะห์ชนิดสารได้แคบ ซึ่งวิธี LC-MS อาศัยหลักการแยกสารผสมที่อยู่ในรูปของสารละลายโดยอาศัยหลักการโครมาโตกราฟี ร่วมกับการวัดมวลสารของเครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิค LC-MS จากสารสกัดเห็ด *Armilaria mellea* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น กรดแกลลิก ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเซลล์มะเร็ง ส่วนสาร syringic acid มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น⁽⁴⁶⁾ การศึกษาสารสกัดจากเห็ด *G. lucidum* ด้วยเมทานอล แล้ววิเคราะห์ชนิดสารด้วย LC-MS พบสารสำคัญ ได้แก่ gallic acid, theanine, catechin, quercetin และ rutin ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน⁽⁴⁷⁾ ตัวอย่างอื่นแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ตัวอย่างการวิเคราะห์ชนิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดรา

สปีชีส์	เทคนิคการวิเคราะห์	รูปแบบสารสกัด	สารที่พบ	คุณสมบัติ	อ้างอิง
<i>Armillaria mellea</i>	LC-MS	Methanolic extract	Gallic Acid	Antioxidant	(46)
			Syringic acid	Anticancer	
				Antioxidant	(46)
				Anti-inflammatory	
				Antimicrobial	
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	LC-MS/MS	Methanolic extract	Demethylcisterol A3	Antibacterial	(47)
<i>Macrolepiota procera</i>	LC-MS	Methanolic extract	Gallic Acid	Antioxidant	(46)
				Anticancer	
			Syringic acid	Antioxidant	(46)
				Anti-inflammatory	
				Antimicrobial	
<i>Ganoderma lucidum</i>	LC-MS/MS	Methanolic extract	Gallic acid	Antioxidant	(47)
				Anticancer	
			Theanine	Immunomodulation	(47)
			Catechin	Antioxidant	(47)
				Anti-inflammatory	
			Quercetin	Antioxidant	(47)
				Anti-inflammatory	
			Rutin	Antioxidant	(47)
<i>Ganoderma resinaceum</i>	LC-MS/MS	Water extract	Phenolic compounds	Antioxidant	(48)
				Anti-inflammatory	
<i>Letinula edodes</i>	LC-MS/MS	Methanolic extract	Vitamin D	Immunomodulation	(49)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LC-MS/MS	Methanolic extract	Vitamin D	Immunomodulation	(49)
<i>Trametes versicolor</i>	LC-MS	Methanolic extract	Quercetin	Antioxidant	(50)
				Anti-inflammatory	
			Rutin	Antioxidant	

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ผิวหนัง

การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการใช้ประโยชน์ในเวชสำอางนั้น ต้องคำนึงถึงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้กับผู้บริโภค การทดสอบความพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นในช่วงหลายปีที่ผ่านมาจึงมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษดังกล่าว ปัจจุบันเซลล์ที่นิยมเลือกใช้คือ เคราติโนไซต์ (keratinocytes) ของมนุษย์ HaCaT เนื่องจากเป็นเซลล์หลักที่พบในชั้นหนังกำพร้า ประมาณร้อยละ 90 ของเซลล์ ซึ่งเป็นชั้นนอกสุดของผิวหนัง เคราติโนไซต์ ถูกสร้างจากชั้นในสุดของผิวหนังคือชั้น stratum basal และเมื่อเจริญต่อไปเรื่อยๆ จะเจริญไปจนถึงชั้น stratum corneum สำหรับเคราติโนไซต์ มีรูปร่างเซลล์แบน และมีนิวเคลียส⁽⁵¹⁾ (ภาพประกอบ 11) เคราติโนไซต์ มีบทบาทสำคัญในการป้องกันร่างกาย เนื่องจากมีโครงสร้างที่แข็งแรง และมีจำนวนมาก ทำให้สามารถป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ขณะเดียวกันก็ลดการสูญเสียความชื้น ความร้อน และองค์ประกอบอื่น ๆ ให้สูญเสียน้อยที่สุด เซลล์ชนิดนี้ยังมีบทบาทในเชิงโครงสร้าง โดยรักษาเซลล์อื่นให้อยู่ในตำแหน่งเดิม นอกจากนี้เคราติโนไซต์ยังทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลังจากได้รับบาดเจ็บที่ผิวหนังอีกด้วย



ภาพประกอบ 11 (a) ตำแหน่งของเคราติโนไซต์ในชั้นผิวหนังกำพร้า (b) ลักษณะของเซลล์
เคราติโนไซต์

ที่มา: (a) Thancguide. (2024). Retrieved January 18, 2024 from <https://thancguide.org/cancer-types/skin/anatomy/>. (b) Lonza. (2024). Retrieved January 19, 2024 from https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/TH/en/Primary-and-Stem-Cells/p/000000000000192627/NHEK-Ad---Human-Epidermal-Keratinocytes%2C-Adult%2C-Single-Donor.

ดังนั้นถ้าเซลล์ชนิดนี้ถูกทำลายหรือเสียหายก็อาจส่งผลต่อชั้นผิวหนัง รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันตามมา การศึกษาความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์นิยมใช้เซลล์เคราติโนไซต์เป็นหลัก สำหรับวิธีในการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์มีหลายวิธี เช่น เทคนิคการย้อมสีเซลล์ (dye exclusion assay) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ขึ้นกับชนิดของสีย้อมต่างๆ ตัวอย่างของสีย้อม ได้แก่ ทริฟเพนบลู (trypan blue) อีโอซิน (eosin) คองโกเรด (congo red) และเอริโทรซิน บี (erythrosine B) วิธีนี้สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตออกจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตได้ เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตเยื่อหุ้มเซลล์จะมีความสมบูรณ์ทำให้สีย้อมไม่สามารถแพร่เข้าไปในเซลล์ได้ แต่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตเยื่อหุ้มเซลล์อาจเสียหายทำให้ไม่สมบูรณ์สีย้อมอาจจะซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ และย้อมติดตัวเซลล์ได้ นอกจากนี้เทคนิควัดการเปล่งแสง (Luminometric assay) สามารถวัดการรอดชีวิตของเซลล์โดยศึกษาจากเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) จากการวัดการเปล่งแสง Luminescence เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ไปทำปฏิกิริยากับลูซิเฟอริน (Luciferin) จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับเอนไซม์ลูซิเฟอเรส จากนั้นจะวัดค่าแสง Luminescence ที่เกิดขึ้นเพื่อประเมินการรอดชีวิตของเซลล์ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความซับซ้อน ราคาแพง นอกจากนี้วิธีที่กล่าวมาข้างต้น เทคนิคการตรวจวัดปริมาณความเข้มของสี (colorimetric assays) เป็นหนึ่งในวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด เนื่องจากตรวจวิเคราะห์ง่าย ใช้ระยะเวลาน้อยประหยัดค่าใช้จ่าย และสารที่นิยมนำมาใช้เพื่อประเมินการรอดชีวิตของเซลล์ที่นิยมใช้ คือ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT)⁽⁵²⁾ สำหรับในงานวิจัยนี้เลือกวิธีการตรวจวัดปริมาณความเข้มของสี (colorimetric assays) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถผลิตเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) เมื่อเติมสารละลาย MTT เอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนสารละลาย MTT จากสีเหลืองให้กลายเป็นผลึกฟอร์มazan (formazan) ที่มีสีม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตไม่สามารถผลิตเอนไซม์ dehydrogenase ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สารละลาย MTT ได้ ทำให้เกิดเป็นสีเหลืองของสารละลาย MTT เช่นเดิม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2022) ที่ศึกษาสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ ของสารสกัดจากเห็ด *G. lucidum* ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาววัดการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้สารละลาย MTT พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 34.5 mg/mL สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้เท่ากับ 50% แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HaCaT⁽⁵³⁾ แสดงว่าสารสกัดปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษารายการสกัดจากเห็ด *Agaricus blazei* ด้วยเอทานอล เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ก่อนนำไปใช้เป็นส่วนผสมของครีมบำรุง พบว่า สารสกัดจากเห็ดที่ความเข้มข้น 100 – 125 µg/mL ไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นที่ 500 µg/mL การมีชีวิตของเซลล์ HaCaT สูงถึง $88.07 \pm 2.76 \%$ ⁽⁵⁴⁾ เช่นเดียวกับสารสกัดจากเห็ด *T. versicolor* เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด HaCaT ด้วยวิธี MTT assay อีกทั้งยังมีคุณสมบัติด้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย⁽⁵⁵⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรอง (filter paper) Whatman No.1	GE-healthcare	UK
กล่องควบคุมอุณหภูมิ (heat box)	Heto	USA
กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope)	Optika	Italy
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope)	Olympus	USA
กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereoscopic microscope)	Olympus	USA
เครื่องเขย่าสาร (shaker)	Sartorius	Germany
เครื่องซังสาร	IKA	Malaysia
เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump)	Rocker Science	Taiwan
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Kubota	Japan
เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-spectrophotometer)	Jenway	UK
เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader)	Lonza	Switzerland
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Fisher Scientific	UK
เครื่องอบตัวอย่างแห้ง (dehydration machine)	Verasu	Thailand
เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนสุญญากาศ (rotary evaporator)	Buchi	Germany
เครื่องวัดความเข้มแสงระดับนาโน (nano photometer)	IMPLEN	Germany
เครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA thermocycler)	Hangzhou Bioer	China
เครื่องถ่ายภาพเจล (gel Doc TM XR+ gel documentation system)	Bio-rad	USA

ตาราง 4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	ประเทศ
เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis apparatus)	Hangzhou Bioer	China
ชุดเครื่องแก้วกรองสารละลาย	Pyrex	USA
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	Sanyo	Japan
ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO ₂ incubator)	Esco	USA
ตู้ปลอดเชื้อ (biosafety cabinet)	HEPACO	USA
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air sterilization oven)	Fisher Scientific	UK
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Tomy	USA

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
1X Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco	USA
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid diammonium salt (ABTS)	Sigma-Aldrich	USA
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	USA
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	USA
Agar	Marine chemical	India
Ascorbic acid	Chem-Supply	Australia
Butylate hydroxy toluene (BHT)	Sigma-Aldrich	USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	RCI labscan	Philippines
Di-sodium hydrogen orthophosphate (Na ₂ HPO ₄)	Ajax	New Zealand
Di-sodium hydrogen phosphate di-hydrate (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	Ajax	New Zealand

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Ethyl alcohol (C_2H_5OH)	P.Wai	Thailand
Ethyl acetate ($C_4H_8O_2$)	P.Wai	Thailand
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Ajax	New Zealand
Favorprep™ DNA extraction mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Favorprep™ Gel/PCR purification mini kit	Favorgen Biotech	Taiwan
Ferrous chloride ($FeCl_2$)	Loba	USA
Ferrozine ($C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$)	Fluka	USA
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco	US
Folin-ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich	USA
Gallic acid ($C_7H_6O_5$)	Sigma-Aldrich	USA
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Kemeus	Australia
Griess reagent	Thermo-Fisher	UK
L-tyrosine ($C_9H_{11}NO_3$)	Phyto Tech Labs	USA
Malt extract	Himedia	India
Methanol AR grade (CH_3OH)	ORCe	New Zealand
Monopotassium phosphate (KH_2PO_4)	Ajax	New Zealand
Penicillin-streptomycin	Gibco	US
Peptone ($C_{13}H_{24}O_4$)	Himedia	India
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco	US
Potassium chloride (KCl)	Ajax	New Zealand
Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)	Ajax	New Zealand
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Ajax	New Zealand
Sodium chloride (NaCl)	Ajax	New Zealand
Sodium dihydrogen orthophosphate (NaH_2PO_4)	Ajax	New Zealand
Sodium nitroprusside ($C_5FeN_6Na_2O$)	Himedia	India
Taq DNA polymerase (Top Taq)	Qiagen	USA
Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$)	Sigma-Aldrich	USA

ตาราง 5 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Trypsin (0.25% trypsin EDTA)	Gibco	US
Tyrosinase	Sigma-Aldrich	USA
ViSafe green gel stain	Vivantis	Malaysia
Yeast extract	Himedia	India
1,500 bp DNA ladder	Thermo Scientific™	Germany

3.ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ที่ศึกษาในงานวิจัย

ตัวอย่างเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์วงศ์ Polyporaceae และ Ganodermaceae ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้จากงานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ⁽⁹⁾ ซึ่งผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) แล้ว เก็บรักษา ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จำนวน 10 สายพันธุ์ รายละเอียดแสดงในตาราง 6 โดยนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน ศึกษาลักษณะของโคโลนี และการเจริญของเส้นใย จากนั้นแยกเส้นใยมาตรวจสอบโครงสร้าง clamp connection และลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้สีย้อม lactophenol cotton blue เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของเส้นใยก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

นอกจากนี้ยังมีเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ที่แยกได้จากดอกเห็ดสกุล *Ganoderma* sp. PP22-01 ซึ่งได้จากจังหวัดสกลนครที่ต้องพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีในข้อ 3.2

ตาราง 6 ข้อมูลเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

วงศ์	สปีชีส์	รหัส	แหล่งที่มา ของตัวอย่าง	GenBank Accession No.ของ ITS
Polyporaceae	<i>Coriopsis dendriformis</i>	PW17-134	ชัยภูมิ	KC867404.1
Polyporaceae	<i>Cubamyces lactineus</i>	PP17-03	สกลนคร	LC176779.1
Polyporaceae	<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	นครพนม	MG719304.1
Polyporaceae	<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	ชัยภูมิ	KU863045.1
Polyporaceae	<i>M. xanthopus</i>	PP17-16	สกลนคร	KX580186.1
Polyporaceae	<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41	ชัยภูมิ	MH141999.1
Polyporaceae	<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	สกลนคร	MH857087.1
Ganodermaceae	<i>Ganoderma fornicatum</i>	PW17-199	ชัยภูมิ	JX840349.1
Ganodermaceae	<i>G. lingzhi</i>	PW17-43	ชัยภูมิ	JQ781867.1
Ganodermaceae	<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	ชัยภูมิ	JX840350.1
Ganodermaceae	<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	สกลนคร	การศึกษานี้

หมายเหตุ: แหล่งที่มาจาก Thamvithayakom และคณะ (2018)

3.2 การระบุชนิดของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS)

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างดอกเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 นำมาศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของดอกเห็ด โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ส่วนของเบสิดิออสปอร์ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเตรียมใยรามาวางบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วยสี lactophenol cotton blue จากนั้นตรวจดูลักษณะของเส้นใย (hyphae) ผนังกัน (septate) และแคลมป์ คอนเนคชัน (clamp connection) ที่เจริญบนอาหาร PDA เพื่อใช้ในการจัดแนกชนิด

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

เนื่องจากไอโซเลท *Ganoderma* sp. PP22-01 ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้พิสูจน์เอกลักษณ์โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงนำเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วันมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด FAVOPREP™ DNA extraction mini kit ตามวิธีในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต สารละลาย

ดีเอ็นเอที่ได้นำไปวัดความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดความเข้มแสงระดับนาโน ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอคำนวณได้จากอัตราส่วนของ OD_{260}/OD_{280} ซึ่งควรมีค่าอยู่ระหว่าง 1.7-2.0⁽⁶⁶⁾ จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้ คู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (forward) และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (reverse)⁽⁶⁷⁾ จากนั้นทำปฏิกิริยาโดยใช้ Top Taq 2x master mix kit ดังแสดงในตาราง 7 และเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง PCR ปรับอุณหภูมิและเวลาตามตาราง 8 จากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1% ในสารละลาย 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ก) เทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1,500 bp DNA ladder) โดยรันผ่านเจลอะกาโรสที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปตรวจสอบแถบแบนดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล แล้วบันทึกภาพ

ตาราง 7 ส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้งาน (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ITS1 (10 ไมโครโมลาร์)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS4 (10 ไมโครโมลาร์)	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	3	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
TopTaq 4X master mix	5	1 ยูนิต
MM Tracer 125X	0.16	-
Water sterile Dnase/RNase-free	9.84	-

หมายเหตุ: ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร

ตาราง 8 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณ ITS

ปฏิกิริยา PCR	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Initial denaturation	94	5 นาที
Denaturation	93	15 วินาที
Annealing	50	30 วินาที
Extension	68	1 นาที
Final Extension	68	10 นาที

ขั้นตอน Denaturation ถึง Extension ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ

3.2.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธีในข้อ 3.2.1 มาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต FAVOPREP™ purification mini kit จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ข้อมูลที่ได้นำมาตรวจสอบความถูกต้อง แล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และ Unite เพื่อตรวจสอบค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) เพื่อใช้ในการระบุชนิดร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาต่อไป ซึ่งค่าร้อยละความเหมือนที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 97 ยอมรับว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน

3.3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดกลุ่มโพลีพอร์และการสกัดสารออกฤทธิ์

ตัวอย่างเชื้อเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 11 สายพันธุ์ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยเห็ดจำนวน 30 ชิ้น นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว yeast malt broth (YM) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 5 ลิตร โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 - 33 °C) นาน 6 สัปดาห์ จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน

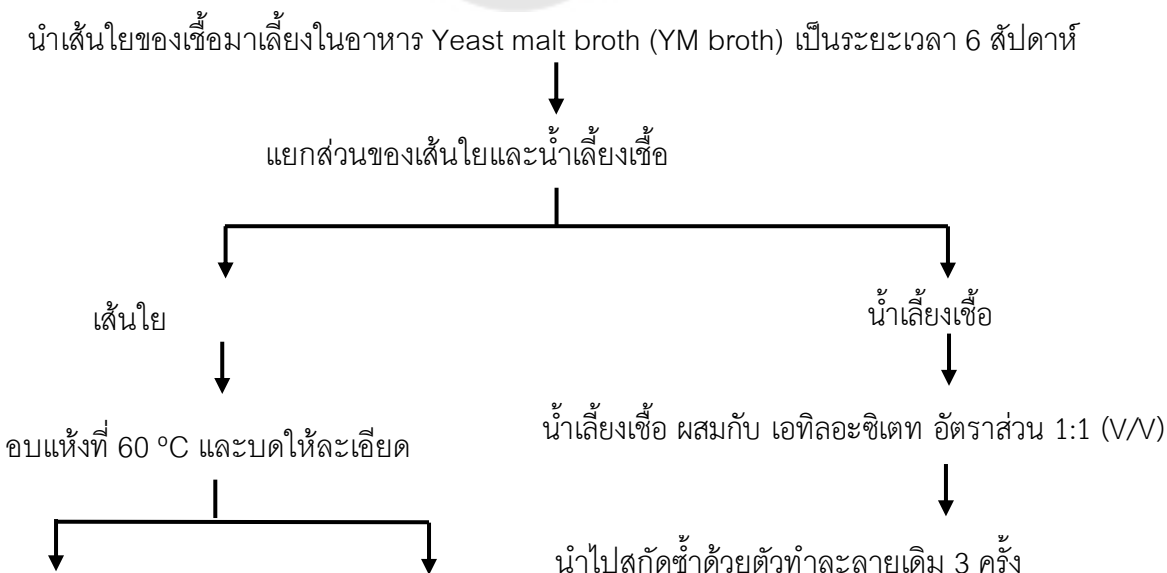
ส่วนของเส้นใยนำมาล้างด้วยน้ำกรอง 3-4 ครั้ง เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดมากับเส้นใยซับด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 24-48 ชั่วโมง หรือจนกว่าเส้นใยแห้ง แล้วนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล 99% ในอัตราส่วนเส้นใยแห้ง 3 กรัมต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร โดยใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ส่วนของเส้นใยบดนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมจำนวน 3 ครั้ง ส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง นำมารวมกันเพื่อทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบ

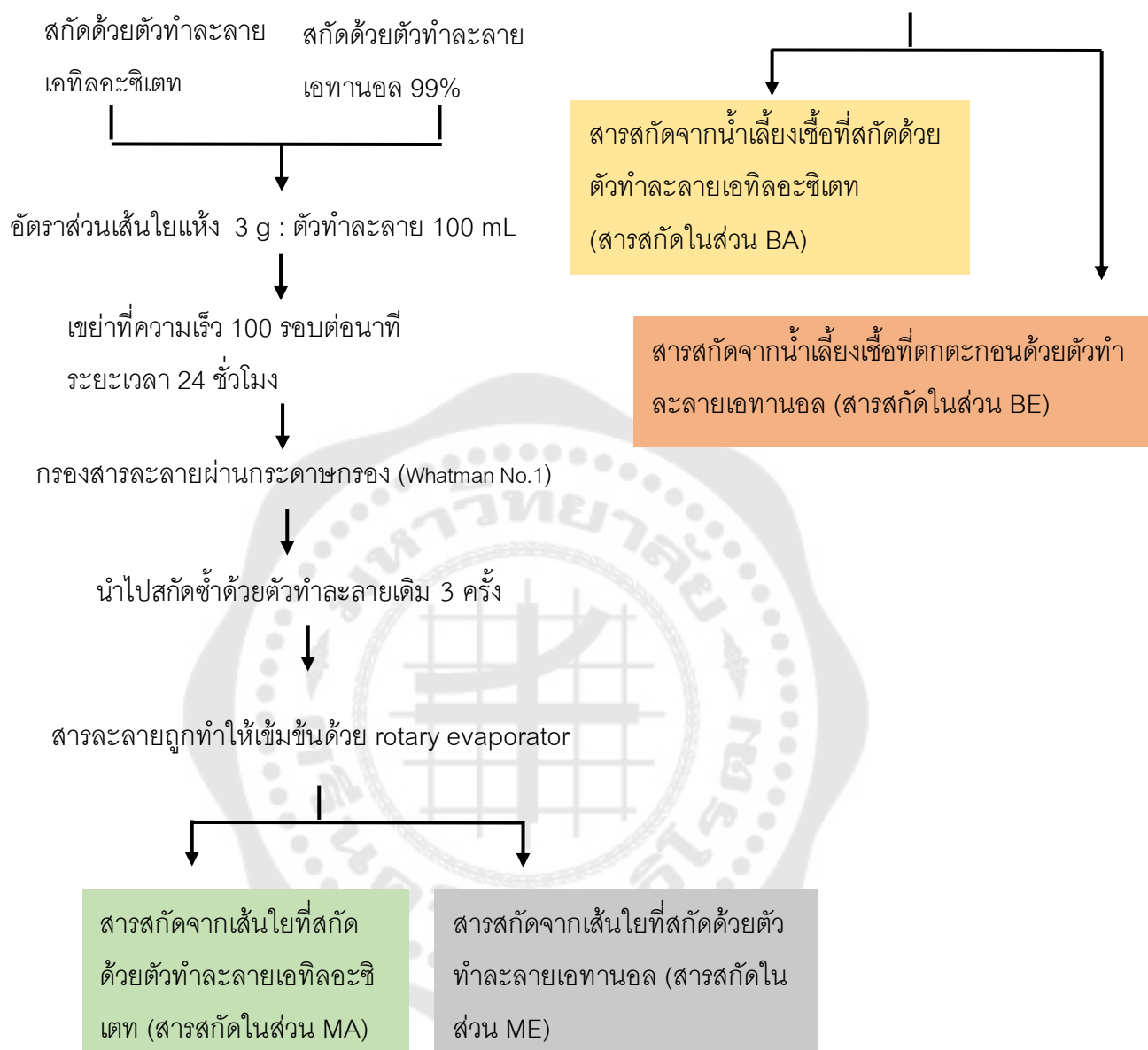
สูญญากาศ (rotary evaporator) สารสกัดที่ได้ทั้ง 2 ส่วนนำไปซึ่งหาน้ำหนักแห้งโดยสารสกัดชั้นนี้เรียกว่า **“สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย”** (mycelium ethyl acetate extract; MA) และ **“สารสกัดเอทานอลจากเส้นใย”** (mycelium ethanolic extract; ME) (ภาพประกอบ 12) แล้วคำนวณหาปริมาณสารสกัดต่อน้ำหนักเส้นใยแห้งดังสมการ

$$\text{ปริมาณสารสกัด (mg/g dry weight)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด (mg)}}{\text{น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดบด (g)}}$$

ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท และเอทานอล 99% โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทก่อน ในอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1 (v/v) จากนั้นแยกส่วนของตัวทำละลายมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบสูญญากาศ โดยจะสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมจำนวน 3 ครั้ง สารสกัดชั้นนี้เรียกว่า **“สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ”** (culture broth ethyl acetate extract; BA) (ภาพประกอบ 12) ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายเอทานอล 99% ในอัตราส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:1 (v/v) บนเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) ข้ามคั้น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเก็บส่วนของตะกอน แล้วนำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C สารสกัดชั้นนี้เรียกว่า **“สารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ”** (culture broth ethanolic extract; BE) (ภาพประกอบ 12) คำนวณหาปริมาณสารสกัดต่อปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณสารสกัด (mg/mL)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด (mg)}}{\text{ปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อ (mL)}}$$





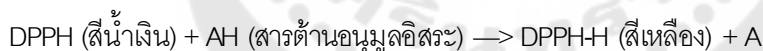
ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวอย่างเห็ดในกลุ่มโพลีพอร์

3.4 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดกลุ่มโพลีพอร์

สารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 ทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ME, BA และ BE จากเห็ดจำนวน 11 สายพันธุ์ นำมาศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ดังนี้ 1) ปรากฏิยาของ 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, 2) ปรากฏิยาของ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activity และ 3) ปรากฏิยากับสาร ferrous ion chelating radical scavenging activity หมายถึง เหตุผลที่ไม่นำสารสกัดในส่วน MA มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากปริมาณสารสกัดไม่เพียงพอ

3.4.1 ปรากฏิยาของ 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่า (two-fold dilution) ด้วยสารละลายเมทานอล (1:2 ถึง 1:2,496 v/v) ดูดสารสกัดที่ผ่านการเจือจางแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 30 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปรากฏิยาบนไมโครเพลท ชุดควบคุมใช้สารละลายเมทานอลแทนสารสกัด โดยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณได้จากค่าที่เจือจางของสารละลาย DPPH ดังสมการ⁽⁵⁸⁾



จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[Ac-As]}{Ac} \times 100$$

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

หมายเหตุ: AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) ซึ่ง H แทนอะตอมไฮโดรเจนที่บ่งบอกถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ DPPH (สีน้ำเงิน)

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหา IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ซึ่งสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือ Butylate hydroxy toluene (BHT) และ Trolox⁽⁵⁹⁾

3.4.2 ปฏิกิริยาของ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) radical scavenging activities

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่นดูตามาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS⁺ เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 176 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด โดยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณได้จากค่าที่จำลงของสารละลาย ABTS ดังสมการ⁽⁶⁰⁾



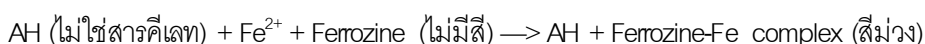
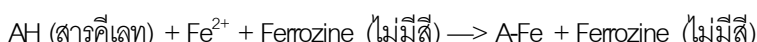
หมายเหตุ: AH (สารต้านอนุมูลอิสระ) ซึ่ง H แทนอะตอมไฮโดรเจนที่บ่งบอกถึงความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ABTS⁺ (สีเขียวอมน้ำเงิน)

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งและค่า IC₅₀ เช่นเดียวกับวิธีในข้อ

3.4.1 โดยสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือ Trolox⁽⁶¹⁾

3.4.3 ปฏิกิริยากับสาร ferrous ion (ferrous ion chelating assay) radical scavenging activities

นำสารสกัดจากเห็ดมาเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่า ด้วยน้ำกลั่นเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.4.2 ดูตามาปริมาตร 120 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl₃) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอโรซีน (ferrozine) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 และ 60 ไมโครลิตร ตามลำดับ ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 10 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด ปฏิกิริยาแสดงในสมการ⁽⁶²⁾



หมายเหตุ: AH (สารคีเลท) ซึ่ง H แทนอะตอมไฮโดรเจนที่บ่งบอกถึงความสามารถของสารที่สามารถแย่งจับกับธาตุประจุบวก

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละของการยับยั้งและค่า IC_{50} เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.4.1 ซึ่งค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้ร้อยละ 50 โดยสารมาตรฐานที่ใช้เทียบเคียงคือ EDTA⁽⁶³⁾

3.5 การหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic content) จากสารสกัดของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์

นำสารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 ปรับความเข้มข้นให้มีค่าเท่ากับ 1 mg/mL ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 10 % (v/v) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7.5 % ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 735 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในรูปไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ($\mu\text{g GAE/mg extract}$)⁽⁶⁴⁾ วิธีนี้จะวัดปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) โดยไม่คำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างของสาร ถ้าสารสกัดมีสารประกอบฟีนอลเป็นองค์ประกอบ หมู่ไฮดรอกซิลซึ่งพบในโครงสร้างจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เกิดเป็นสารสีน้ำเงิน ดังนั้นถ้าสีน้ำเงินเข้มมากก็แสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลมาก

3.6 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ด้วยวิธี NO radical scavenging activity

นำสารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 มาเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่าด้วยสารละลาย DMSO (1:2 ถึง 1:2,496 v/v) ทดสอบในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยดัดแปลงวิธีของ Inkanuwat และคณะ⁽⁶⁵⁾ โดยดูดสารสกัดที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง 30 นาที แล้วเติมสารละลาย Griess reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยชุดควบคุมใช้ DMSO แทนสารสกัด โดยคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณได้จากสีที่จางลงของสารละลาย Griess reagent ดังสมการ

สภาวะปกติ: sodium nitroprusside (pH 7.4) $\rightarrow$ nitric oxide $\rightarrow$ nitrite ion

nitrite ion + Griess reagent $\rightarrow$ Azo complex (สีชมพู)

สารต้านอนุมูลอิสระ: sodium nitroprusside (pH 7.4) $\rightarrow$ nitric oxide + สารต้านอนุมูลอิสระ $\rightarrow$ nitrite ion ที่ลดลง + Griess reagent $\rightarrow$ Azo complex (สีใส)

จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งจากสูตร

ร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) = $[(Ac-As)/Ac] \times 100$

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (DMSO) และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหา IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกิดไนโตรที่ได้ร้อยละ 50

3.7 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 มาเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่าด้วยสารละลาย DMSO (1:2 ถึง 1:2,496 v/v) ทดสอบในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยดัดแปลงวิธีของ Ma และคณะ⁽⁶⁶⁾ ดูดสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) และเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (ตาราง 9) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และเติมสารละลายแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งจากสูตร

ร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) = $[(A-B)-(C-D)/(A-B)] \times 100$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม, B = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส, C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และ D = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ไม่เติมเอนไซม์ไทโรซิเนส

ค่าร้อยละการยับยั้งของสารสกัดแต่ละความเข้มข้นนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดเพื่อคำนวณหา IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50

ปกติเอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น แอล-ไทโรซิน เกิดเป็นสารสีน้ำตาลของเมลานิน ถ้าสารสกัดที่ทดสอบมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ การเกิดสีน้ำตาลของเมลานินจะลดลง

ตาราง 9 ปริมาตรของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

	สารสกัด (ไมโครลิตร)	บัฟเฟอร์ (ไมโครลิตร)	เอนไซม์ไทโรซิเนส (ไมโครลิตร)	แอล-ไทโรซิน (ไมโครลิตร)
A : Control	-	80	40	120
B : Control Blank	-	120	-	120
C : Sample	40	40	40	120
D : Sample Blank	40	80	-	120

3.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์

3.8.1 การเพาะเลี้ยงและการย้ายเซลล์ด้วยวิธี Trypsinization

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ Human Immortalized Epidermal Cells, HaCaT (iCell-h066) เป็นเซลล์ผิวหนัง (normal epidermal tissue) ของมนุษย์ โดยการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เมื่อนำเซลล์ออกมาจากไนโตรเจนเหลวปล่อยให้ผลึกน้ำแข็งละลายที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 นาที จากนั้นย้ายเซลล์ทั้งหมดลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตรในอาหาร Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ในตู้บ่มเซลล์ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเซลล์เจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 70 - 80% ของพื้นที่ขวดจะย้ายเซลล์โดยการดูดอาหารเก่าทิ้งและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline; PBS buffer) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อล้างเซลล์ จากนั้นดูดสารละลาย PBS ทิ้ง แล้วเติม 0.25% Trypsin-EDTA ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วนำสารแขวนลอยเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ขวดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นำไปบ่มที่ตู้บ่มเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อไป

3.8.2 การเก็บรักษาเซลล์

เมื่อเซลล์ HaCaT เจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 70-80% จะทำการย้ายเซลล์ตามการทดลองในข้อ 3.8.1 จากนั้นนำตะกอนเซลล์ มาเติมอาหารสำหรับเก็บเซลล์ (cryopreservative medium) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยเซลล์ขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอด cryopreservative tube ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเซลล์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C ซ้ำมคืน ก่อนย้ายเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

3.8.3 การเตรียมเซลล์

ก่อนการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HaCaT จะปรับปริมาณของเซลล์ที่เหมาะสม เมื่อเซลล์ HaCaT เจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 70-80% จะทำการย้ายเซลล์ตามการทดลองในข้อ 3.8.1 ซึ่งจะทดสอบปริมาณเซลล์ในช่วง $2 \times 10^3 - 8 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี MTT assay ตามการทดลองในข้อ 3.8.4 สำหรับการปรับปริมาณเซลล์จะเริ่มต้นจากการนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้สีทริฟเพนบลู (trypan blue) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ไมโครมิเตอร์ในการนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต จากสูตรที่แสดงนี้

เซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) = ค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่มีชีวิต $\times$ dilution factor $\times 10^4$

จากนั้นจะปรับปริมาณเซลล์ จากสูตรที่แสดงนี้

ปริมาณเซลล์ที่ต้องเตรียม (ไมโครลิตรต่อหลุม) = ปริมาณเซลล์ที่ต้องการ / ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

จากการทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม พบว่า 8×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.926 – 1.058 ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นจึงใช้ปริมาณเซลล์นี้เป็นปริมาณเซลล์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี MTT assay ในการทดลองถัดไป

3.8.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี MTT

assay

นำสารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 ละลายในสารละลาย DMSO เข้มข้น 0.1 % มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเจือจางเป็นลำดับที่ละ 2 เท่า ด้วยสารละลาย DMSO เข้มข้น 0.1 % (1:2 ถึง 1:256 v/v) ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 8×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ชุดควบคุมคือเซลล์ที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM แทนสารสกัด จากนั้นนำไปบ่มที่ในตู้บ่มเซลล์ 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เมื่อครบระยะเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ออกเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 99.9% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท⁽⁶⁷⁾ คำนวณหาค่าร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ (% viability) จากสูตร

$$\text{การรอดชีวิตของเซลล์ (\% viability)} = [As/Ac] \times 100$$

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เซลล์ปกติที่ไม่ใส่สารสกัด) และ As = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ (เซลล์ที่ใส่สารสกัด)

โดยเซลล์ที่มีชีวิตสามารถผลิตเอนไซม์ dehydrogenase ได้ เมื่อเติมสารละลาย MTT เอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนสารละลาย MTT เป็นผลึก formazan ทำให้เกิดสีม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตไม่สามารถผลิตเอนไซม์ dehydrogenase ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สารละลาย MTT ได้ ทำให้เกิดเป็นสีเหลืองของสารละลาย MTT เช่นเดิม⁽⁶⁸⁾

3.9 การวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ทั้งหมดด้วยวิธี Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS)

สารสกัดเห็ดจากวิธีการทดลองในข้อ 3.3 ที่ให้ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และด้านการอักเสบที่ดี นำมาวิเคราะห์หาชนิดของสารเมแทบอลิต์ทั้งหมดแบบไม่จำเพาะชนิด (untargeted) ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยใช้ Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) คอลัมน์ C18 สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดในส่วน BA และคอลัมน์เอไมด์ (amide) สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดในส่วน BE โดยทั้ง 2 คอลัมน์มีขนาดกว้าง 1.7 ไมโครเมตร ยาว 2.1 มิลลิเมตร x 100 มิลลิเมตร โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 0.35 มิลลิตรต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 °C โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่มีสัดส่วนของสาร A และ B ดังตาราง 10 ซึ่งสารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ UPLC แล้วจะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่โหมดไอออนบวก (positive ion mode: pos) และโหมดไอออนลบ (negative ion mode: neg) และวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ซึ่งในการศึกษานี้กำหนดให้สแกนหาโมเลกุลของสารที่มีขนาดระหว่าง 70-1,050 m/z แล้วนำมาวิเคราะห์เทียบกับฐานข้อมูล BGI Metabolome

ตาราง 10 สัดส่วนของสารละลายเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค UPLC

เวลา (นาที)	สารละลาย A	สารละลาย acetonitrile (B)
0-1	98%	2%
1-9	98% - 2%	2% - 98%
9-12	2% - 98%	98%
12-12.1	2% - 98%	98% - 2%
12.1-15	98%	2%

หมายเหตุ: สารละลาย A ในโหมดไอออนบวก (positive ion mode: pos) คือ 0.1% formic acid และโหมดไอออนลบ (negative ion mode: neg) คือ 10 mM ammonium formate

3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics 21

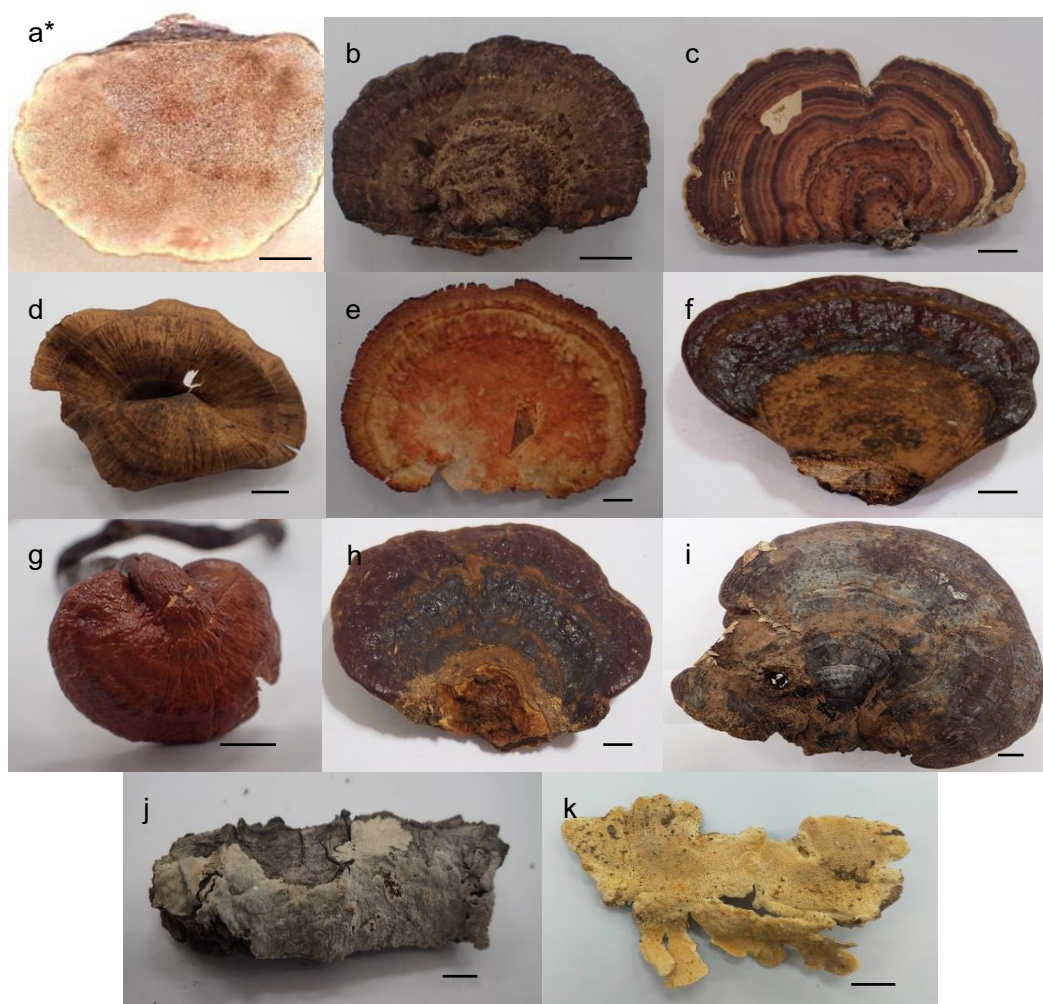
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. เห็ดโพลีพอร์ที่ใช้ในการศึกษา และการระบุชนิดโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

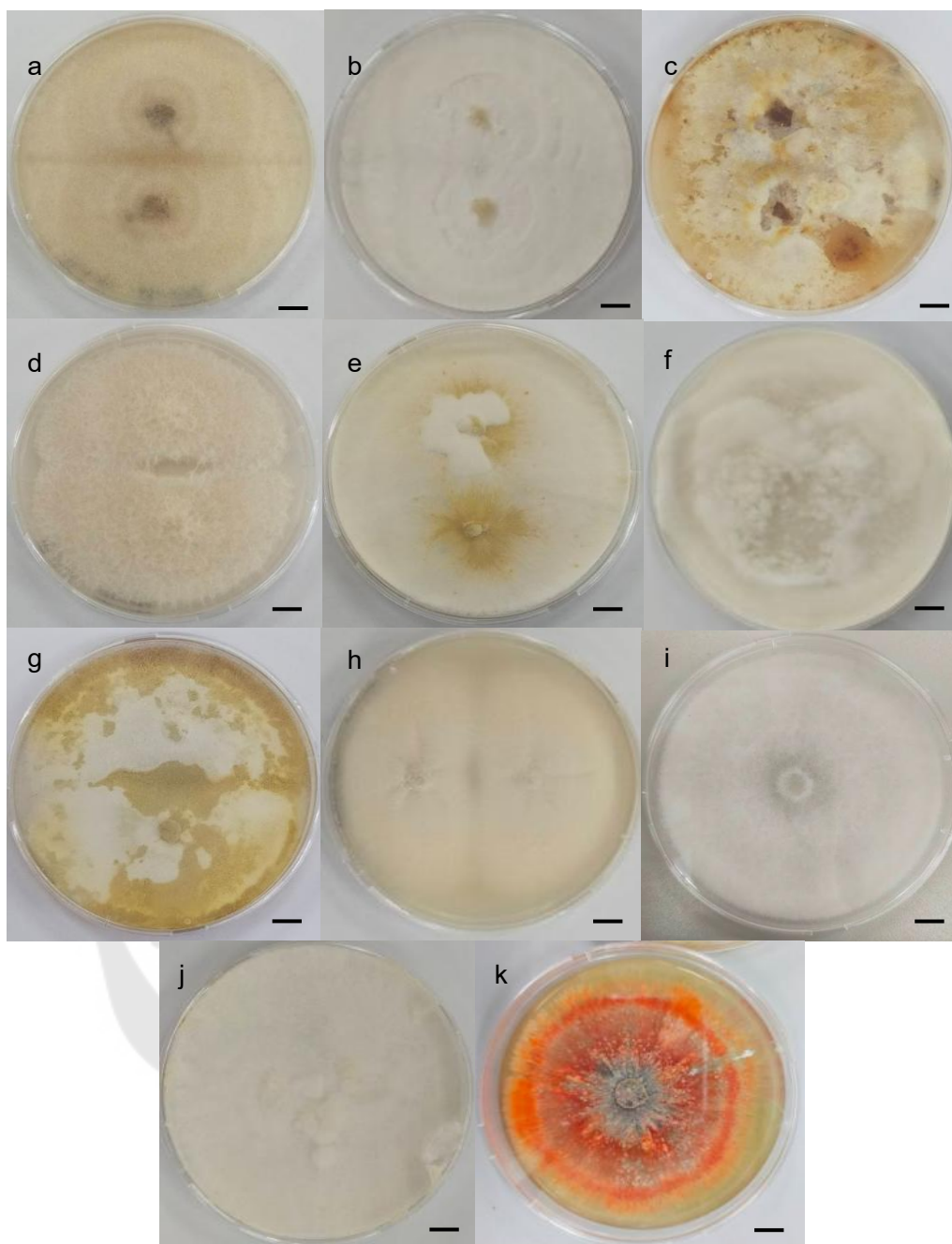
ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์กลุ่มโพลีพอร์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ทั้งหมดจำนวน 11 สายพันธุ์ (ภาพประกอบ 13 และ 14) ซึ่งได้จากงานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ ในปี ค.ศ. 2018⁽⁹⁾ จำนวน 10 สายพันธุ์ ประกอบด้วยวงศ์ Polyporaceae จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Corioloropsis dendriformis* PW17-134, *Cubamycetes lactineus* PP17-03, *Funalia aspera* NP17-02, *Microporus vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-16, *Trametes hirsuta* PW17-41 และ *T. sanguinea* PP17-18 ส่วนวงศ์ Ganodermaceae จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma fornicatum* PW17-199, *G. lingzhi* PW17-43, และ *G. mastoporum* PW17-111 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ทางสัณฐานและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacers (ITS) แล้ว

โดยงานวิจัยนี้ได้คัดแยกเพาะเลี้ยงเห็ดวงศ์ Ganodermaceae เพิ่มอีกจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma* sp. PP22-01 จากดอกเห็ด ที่รวบรวมได้จากจังหวัดสกลนคร ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่า ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นแผ่นหนา โค้งครึ่งวงกลม ขนาดใหญ่ เนื้อแข็งและเหนียว ขนาด (กว้าง x ยาว x หนา) เท่ากับ 13.0 x 15.8 x 0.2-1.1 เซนติเมตร ด้านหลังของดอกเห็ดมีสีขาวครีม มีรพูน พื้นผิวหยาบ ด้านหน้ามีลักษณะคล้ายคลื่น มีริ้วสีน้ำตาลเข้มสลับกับสีดำ (ภาพประกอบ 15) เบสิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลมรี ปลายมน สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล ผิวขรุขระ มีขนาด (ยาว x กว้าง) เท่ากับ 5.90–9.24 x 4.69–5.87 ไมโครเมตร ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในระยะแรกมีสีขาว จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีครีมน้ำตาล พบโครงสร้างแคลมป์ คอนเนคชั่น (clamp connection) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยืนยันว่าเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นเส้นใยเห็ดกลุ่มเบสิดิโอมัยซีส (basidiomycetes) จริง

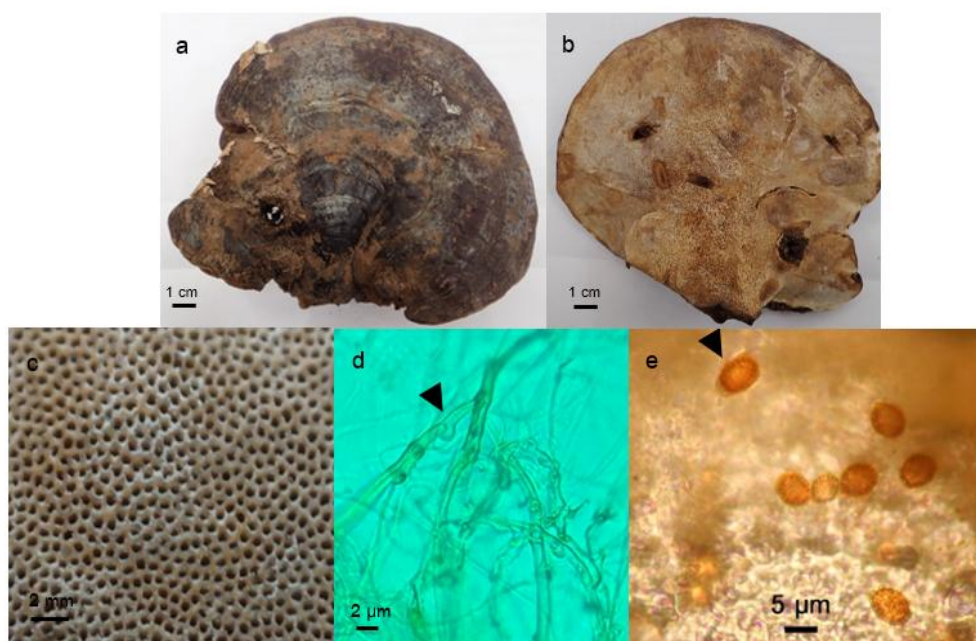


ภาพประกอบ 13 ฟรุ้ตติงบอดีของเห็ดกลุ่มโพลีพอร์ (a) *C. dendriformis* PW17-134, (b) *F. aspera* NP17-02, (c) *M. vernicipes* PW17-173, (d) *M. xanthopus* PP17-16, (e) *T. sanguinea* PP17-18, (f) *G. fornicatum* PW17-199, (g) *G. lingzhi* PW17-43, (h) *G. mastoporum* PW17-111, (i) *Ganoderma* sp. PP22-01 (j) *C. lactineus* PP17-03 และ (k) *T. hirsuta* PW17-41 Bars = 1 เซนติเมตร

* ที่มา: งานวิจัยของ Thamvithayakorn และคณะ⁽¹⁰⁾



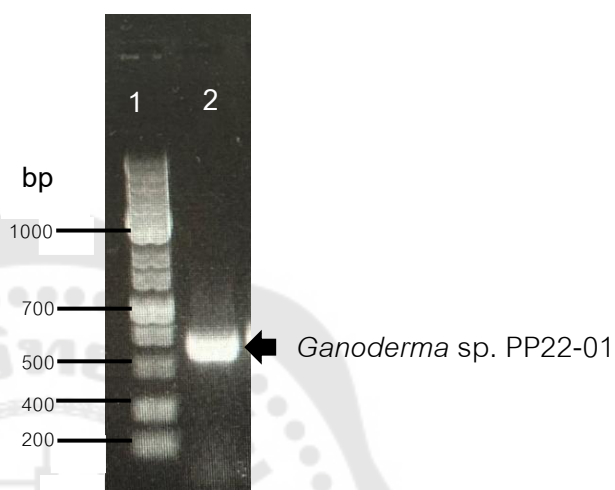
ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (a) *C. dendriformis* PW17-134, (b) *C. lactineus* PP17-03, (c) *F. aspera* NP17-02, (d) *G. fornicatum* PW17-199, (e) *G. lingzhi* PW17-43, (f) *G. mastoporum* PW17-111, (g) *Ganoderma* sp. PP22-01, (h) *M. vernicipes* PW17-173, (i) *M. xanthopus* PP17-16, (j) *T. hirsuta* PW17-41 และ (k) *T. sanguinea* PP17-18 Bars = 1 เซนติเมตร



ภาพประกอบ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 (a) ด้านหน้าของดอกเห็ด, (b) ด้านหลังของดอกเห็ด, (c) ลักษณะของรูด้านหลังดอกเห็ด, (d) แคลมป์ คอนเนคชั่น (ลูกศร) และ (e) เบสิดิโอสปอร์ (ลูกศร)

เนื่องจากเห็ดในสกุล *Ganoderma* มีความซับซ้อนในการระบุชนิดในระดับสปีชีส์ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ร่วมด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์พบว่า ITS ของตัวอย่างมีขนาดประมาณ 550 คู่เบส (ภาพประกอบ 16) เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบ ความถูกต้องด้วยโปรแกรม Chromas พบว่า ITS มีขนาดเท่ากับ 551 คู่เบส เมื่อเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่าตัวอย่างเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 มีค่าร้อยละความเหมือนสูงสุด (% identity) เท่ากับร้อยละ 99.64 กับ *Ganoderma acaciicola* BJFC 030114 (accession number NR_182900.1) รองลงมาคือ *Ganoderma destructans* CBS 139793 (accession number NR_132919.1) เท่ากับร้อยละ 98.55 จากการทดลองยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ของเห็ดชนิดนี้ได้ เนื่องจากมีค่าร้อยละความเหมือนของ ITS มากกว่าร้อยละ 97 กับเห็ด 2 สปีชีส์ ที่กล่าวข้างต้นที่สำคัญขนาดของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ดไอโซ

เลข PP22-01 มีขนาดเล็กกว่า *G. acaciicola* และ *G. destructans* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงให้ชื่อว่า *Ganoderma* sp. PP22-01 ทั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ได้ submit ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้อccession number PQ651439



ภาพประกอบ 16 ผลเจลิอิเล็กโทรโฟรีซิสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 หลังจากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR เลนที่ 1 คือ DNA ladder และเลนที่ 2 คือ ผลผลิต PCR บริเวณ ITS ขนาด 551 bp

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดและการสกัดสารออกฤทธิ์

ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์จำนวน 11 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM นาน 6 สัปดาห์ พบว่าลักษณะของเส้นใยเห็ดทั้ง 11 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน เช่น สีของเส้นใยในแต่ละระยะของการเจริญ ความหนาแน่นของเส้นใย การเปลี่ยนสีของอาหารเหลว รวมทั้งอัตราการเจริญ เป็นต้น เส้นใยเห็ดส่วนใหญ่เริ่มต้นมีสีขาว จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีครีม เหลือง ถึงสีน้ำตาล รายละเอียดในตาราง 11 จากผลการทดลองพบว่าเห็ดสกุล *Ganoderma* ทั้ง 4 สายพันธุ์ (*G. fornicatum* PW17-199, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-111 และ *Ganoderma* sp. PP22-01) มีอัตราการเจริญบนอาหารเหลวเร็วกว่าเห็ดสายพันธุ์อื่น สามารถเจริญเต็มหน้าอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 5 ลิตร ได้ภายใน 3 สัปดาห์ ในขณะที่เห็ดสายพันธุ์อื่นใช้เวลา 4 สัปดาห์ จึงเจริญเต็มหน้าอาหาร (ภาพประกอบ 17)

ส่วนการสกัดสารทั้งส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิดได้แก่ เอทานอล และ เอทิลอะซิเตท ได้สารสกัดตัวอย่างละ 4 สารสกัด ได้แก่ สารสกัดเอทานอลจากเส้นใย (mycelium ethanolic extract; ME), สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (mycelium ethyl-acetate extract; MA), สารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth ethanolic extract; BE) และ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth ethyl-acetate extract; BA) ตามลำดับ จากตัวอย่างเห็ดทั้งสิ้น 11 สายพันธุ์ ได้สารสกัดจำนวน 44 สารสกัด รายละเอียดในตาราง 12

ตาราง 11 ลักษณะการเจริญของเห็ดโพลีพอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM

สปีชีส์	รหัส	ลักษณะการเจริญ
<i>Coriopsis dendriformis</i>	PW17-134	เส้นใยสีขาว บางส่วนมีสีน้ำตาลอ่อน หย่น และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบ 17a)
<i>Cubamycetes lactineus</i>	PP17-03	เส้นใยสีขาว และบาง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบ 17b)
<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	เส้นใยสีขาว บางส่วนมีสีน้ำตาลเข้ม และบางอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม (ภาพประกอบ 17c)
<i>Ganoderma fornicatum</i>	PW17-199	เส้นใยสีขาว และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17d)
<i>G. lingzhi</i>	PW17-43	เส้นใยสีขาว บางส่วนมีสีเหลือง และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17e)
<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	เส้นใยสีขาว และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบ 17f)
<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	เส้นใยสีขาว มีบางส่วนสีน้ำตาลเข้ม และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17g)
<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	เส้นใยสีขาวหย่น และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน (ภาพประกอบ 17h)
<i>M. xanthopus</i>	PP17-16	เส้นใยสีขาว เหนียว และบาง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17i)
<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41	เส้นใยสีขาว และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17j)
<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	เส้นใยสีขาวหย่น และหนา อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพประกอบ 17k)



ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (a) *C. dendriformis* PW17-134, (b) *C. lactineus* PP17-03, (c) *F. aspera* NP17-02, (d) *G. fornicatum* PW17-199, (e) *G. lingzhi* PW17-43, (f) *G. mastoporum* PW17-111, (g) *Ganoderma* sp. PP22-01, (h) *M. vernicipes* PW17-173, (i) *M. xanthopus* PP17-16, (j) *T. hirsuta* PW17-41 และ (k) *T. sanguinea* PP17-18 Bars = 6 เซนติเมตร

จากสารสกัดที่ได้เมื่อคำนวณหาปริมาณสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักเส้นใยแห้ง หรือ ต่อ ปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) ของเห็ดทุกสายพันธุ์มีปริมาณ สารสกัดมากที่สุดอยู่ในช่วง 345 -1,384 mg/L รองลงมาคือ สารสกัดในส่วน ของ BA และ ME โดยสารสกัดทั้ง 2 ส่วน มีปริมาณของสารสกัดอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันคือ 44 -189 mg/L และ 71 -195 mg/g dry weight ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากเส้นใย (MA) มีปริมาณ สารสกัดน้อยกว่า 1 mg/g dry weight ในทุกตัวอย่างของเห็ด ดังนั้นจึงไม่นำไปศึกษาสารออกฤทธิ์ ในการทดลองต่อไป



ตาราง 12 ปริมาณสารสกัดของเห็ดโพลีพอร์จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลาย
เอทานอลและเอทิลอะซิเตท

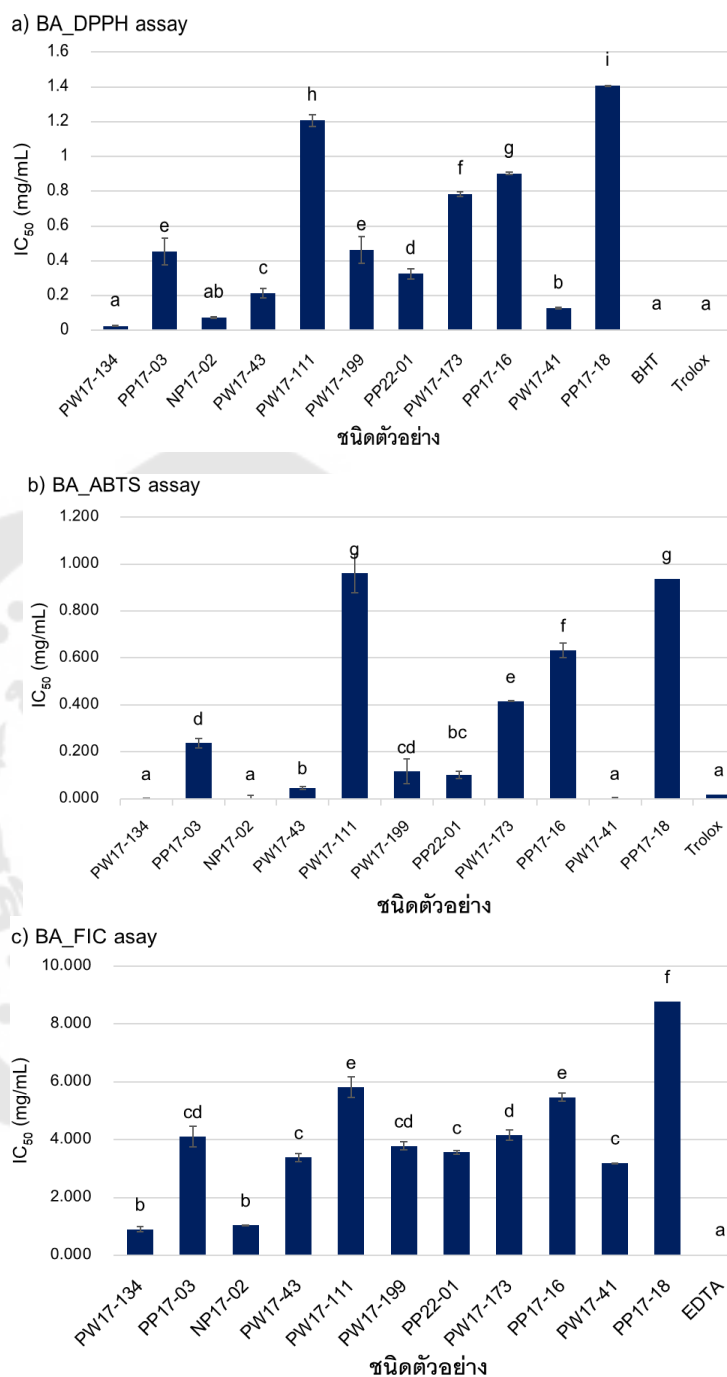
สปีชีส์	รหัส	สารสกัดจากเส้นใย		สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ	
		(mg/g dry weight)		(mg/L)	
		เอทิลอะซิเตท เตท (MA)	เอทานอล (ME)	เอทิลอะซิเตท เตท (BA)	เอทานอล (BE)
<i>Corioloopsis dendriformis</i>	PW17-134	<1	181	133	620
<i>Cubamyces lactineus</i>	PP17-03	<1	108	189	383
<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	<1	137	137	1384
<i>Ganoderma fornicatum</i>	PW17-199	<1	105	65	487
<i>G. lingzhi</i>	PW17-43	<1	109	133	1416
<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	<1	184	92	345
<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	<1	71	44	502
<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	<1	201	123	452
<i>M. xanthopus</i>	PP17-16	<1	195	104	432
<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41	<1	197	61	578
<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	<1	140	112	687

3. คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

จากผลการทดลองในข้อ 2 สารสกัดในส่วนของ BA, BE และ ME ของเห็ด 11 สายพันธุ์ได้นำมาศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ 1) DPPH assay 2) ABTS assay และ 3) ferrous ion chelating assay (FIC assay) เพื่อยืนยันคุณสมบัติของสารสกัด โดยรายงานในรูปของค่าความเข้มข้นของสารสกัดต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50})

สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BA)

สารสกัดจากเห็ดในส่วนของ BA มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay โดยเฉพาะสารสกัดจาก *C. dendriformis* PW17-134 และ *F. aspera* NP17-02 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.026 ± 0.002 mg/mL และ 0.074 ± 0.004 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่ต่างจากสารควบคุมเชิงบวก (positive control) BHT ($IC_{50} = 0.006 \pm 0.003$ mg/mL) และ Trolox (0.004 ± 0.001 mg/mL) รองลงมาคือสารสกัดจาก *T. hirsuta* PW17-41 ($IC_{50} = 0.127 \pm 0.013$ mg/mL) และ *G. lingzhi* PW17-43 ($IC_{50} = 0.212 \pm 0.078$ mg/mL) (ภาพประกอบ 18a) จากผลการทดลองสอดคล้องกับวิธี ABTS assay คือสารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดคือ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 และ *T. hirsuta* PW17-41 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.002 ± 0.001 mg/mL, 0.001 ± 0.001 mg/mL และ 0.003 ± 0.001 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่ต่างจากสารควบคุมเชิงบวก BHT (ภาพประกอบ 18b) ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธี FIC assay พบว่าสารสกัดจาก *C. dendriformis* PW17-134 ($IC_{50} = 0.903 \pm 0.003$ mg/mL) และ *F. aspera* NP17-02 ($IC_{50} = 1.084 \pm 0.003$ mg/mL) ให้ผลดีที่สุด แม้จะมีค่า IC_{50} สูงกว่าสารควบคุมเชิงบวก EDTA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพประกอบ 18c) อย่างไรก็ตามสารสกัดในส่วนของ BA จากเห็ดทุกสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีแตกต่างกัน (ตาราง 13)



ภาพประกอบ 18 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BA) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC assay เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-i คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ

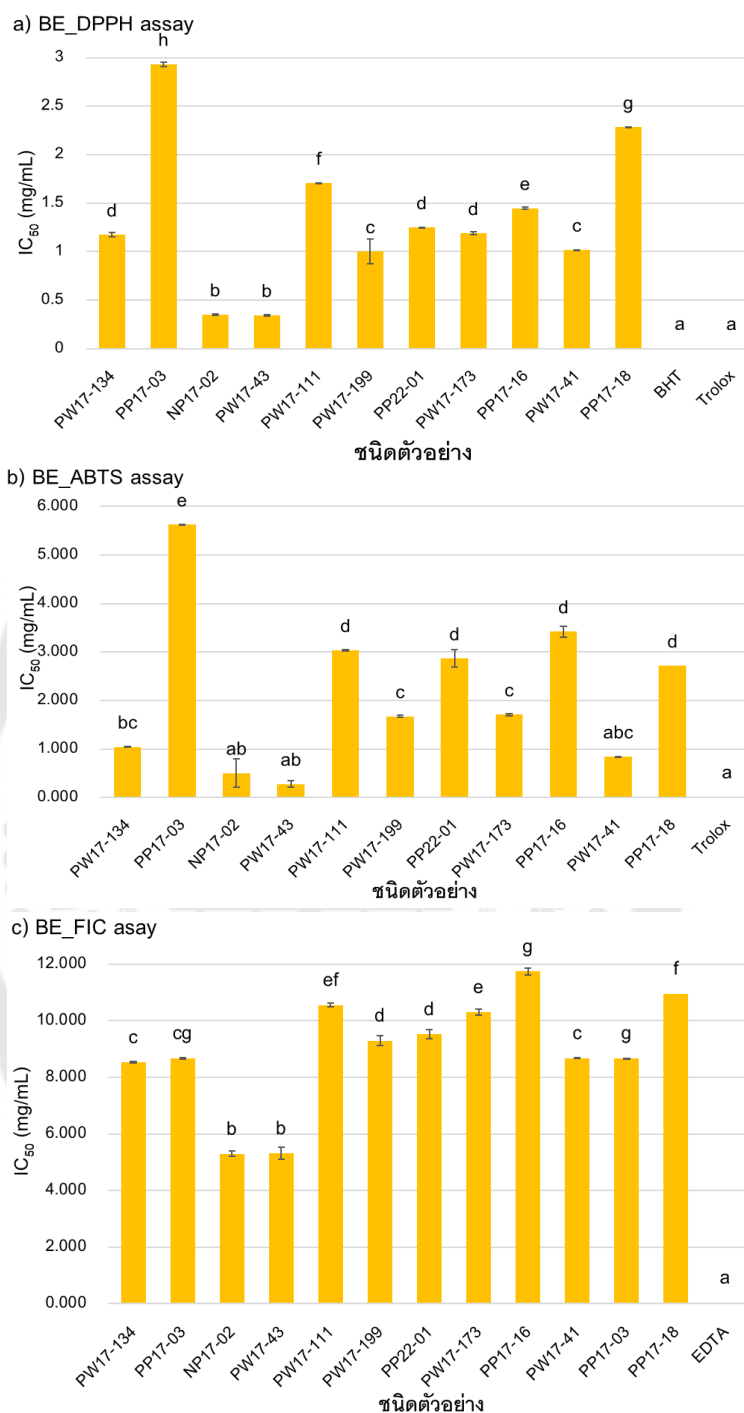
$$p < 0.05$$

สารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE)

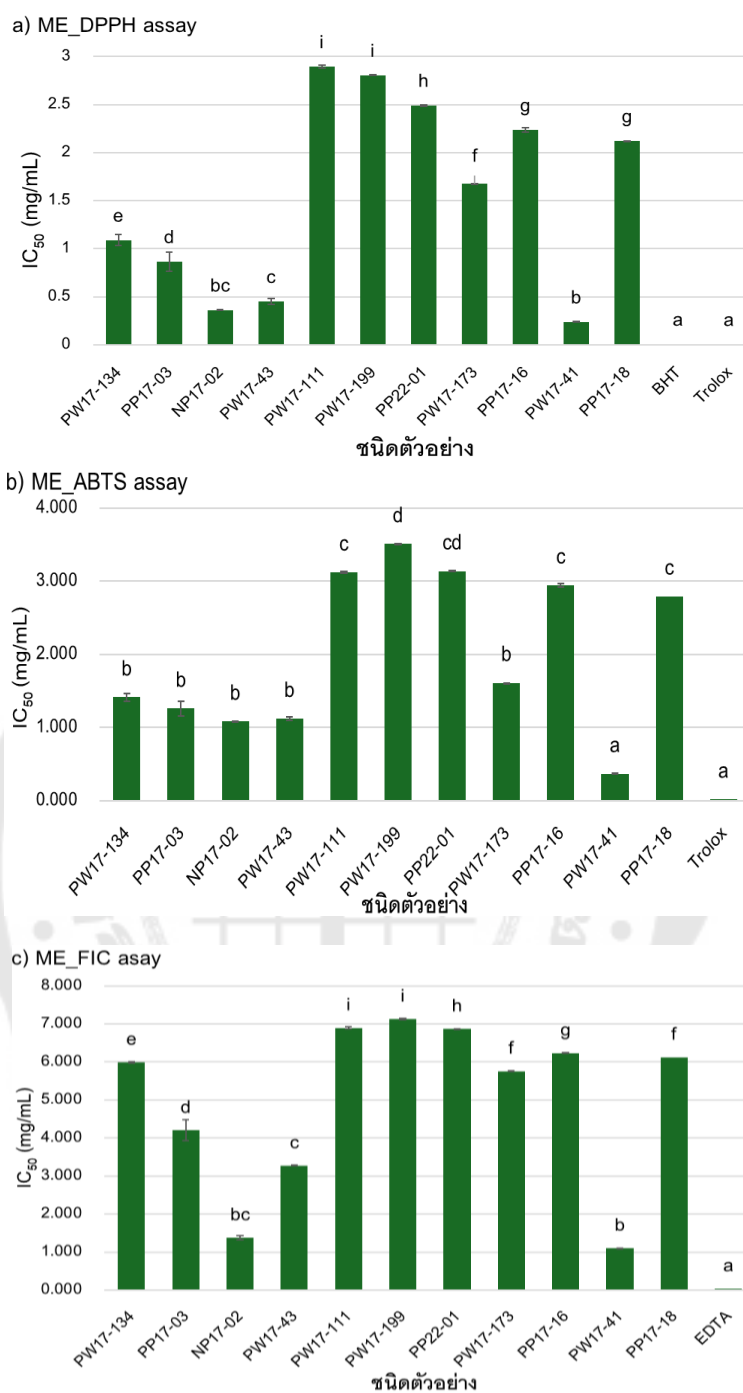
สารสกัดในส่วนของ BE มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระรองจากสารสกัดในส่วนของ BA โดยเทียบจากค่า IC_{50} ที่มีค่าสูงกว่าสารสกัดของ BA โดยสารสกัดที่มีคุณสมบัติสูงในส่วนของ BE ได้แก่ *G. lingzhi* PW17-43 และ *F. aspera* NP17-02 ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทั้ง 3 วิธี โดยสารสกัดจาก *G. lingzhi* PW17-43 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.344 ± 0.023 mg/mL, 0.277 ± 0.010 mg/mL และ 5.310 ± 0.029 mg/mL เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FIC assay ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *F. aspera* NP17-02 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.351 ± 0.023 mg/mL (เมื่อวิเคราะห์ด้วย DPPH assay), 0.504 ± 0.007 mg/mL (เมื่อวิเคราะห์ด้วย ABTS assay) และ 5.294 ± 0.030 mg/mL (เมื่อวิเคราะห์ด้วย FIC assay) ซึ่งเห็นทั้งสองสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์เดียวกับที่มีคุณสมบัติดีในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดในส่วนของ BA อีกด้วย นอกจากนี้สารสกัดจากเห็ดที่มีคุณสมบัติรองลงมาได้แก่ *C. dendriformis* PW17-134, *G. fornicatum* PW17-199 และ *Ganoderma* sp. PP22-01 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 19 และตาราง 13)

สารสกัดเอทานอลจากเส้นใย (ME)

สารสกัดจากเส้นใยในส่วนของ ME พบว่าสารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41 มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีต่าง ๆ ซึ่งต่างจากสารสกัดในส่วนของ BA และ BE โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.238 ± 0.001 mg/mL, 0.369 ± 0.001 mg/mL และ 1.101 ± 0.008 mg/mL เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FIC assay ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเห็ดที่ให้ผลรองลงมาคือ *F. aspera* NP17-02 และ *G. lingzhi* PW17-43 นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134, *M. vernicipes* PW17-173 และ *C. lactineus* PP17-03 ยังแสดงคุณสมบัติที่ดีอีกด้วย (ภาพประกอบ 20 และตาราง 13)



ภาพประกอบ 19 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC assay เมื่อใช้ภาษาอังกฤษ a-h คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



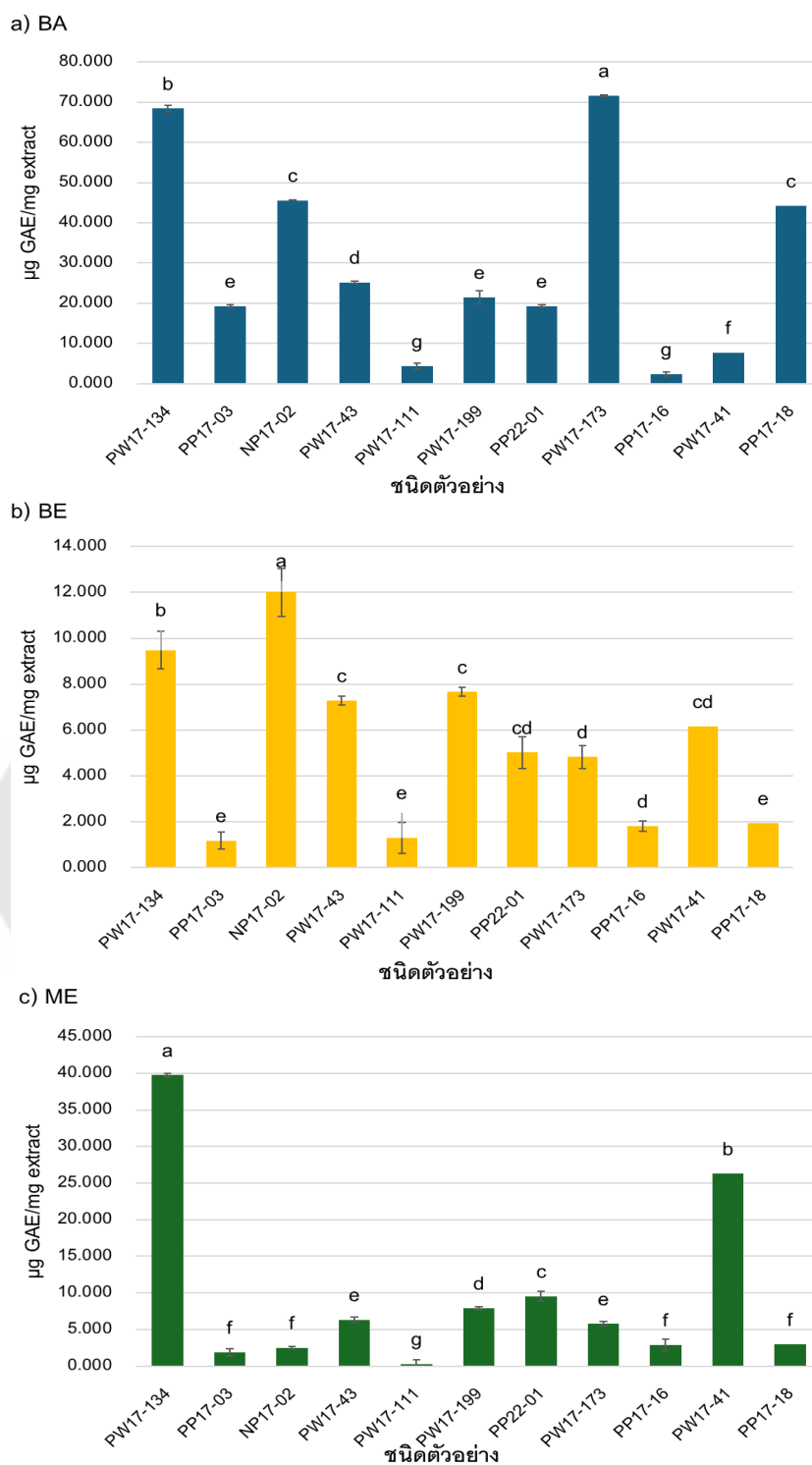
ภาพประกอบ 20 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากเส้นใย (ME) เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี (a) DPPH assay, (b) ABTS assay และ (c) FIC assay เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-i คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ

$p < 0.05$

ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดในส่วน BA, BE และ ME ของเห็ดทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดในส่วน BA มีปริมาณสูงที่สุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง $2.314 \pm 0.288 \mu\text{g GAE/g extract}$ ถึง $71.623 \pm 1.677 \mu\text{g GAE/mg extract}$ รองลงมาคือสารสกัดในส่วน ME ($0.302 \pm 0.189 \mu\text{g GAE/g extract}$ ถึง $39.736 \pm 0.499 \mu\text{g GAE/mg extract}$) และ BE ($1.811 \pm 0.680 \mu\text{g GAE/mg extract}$ ถึง $12.000 \pm 0.822 \mu\text{g GAE/mg extract}$) (ตาราง 14) โดยสารสกัดที่พบปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด ได้แก่ สารสกัดจาก *M. vernicipes* PW17-173 ในส่วนของ BA มีค่าเท่ากับ $71.623 \pm 1.677 \mu\text{g GAE/mg extract}$ รองลงมาได้แก่สารสกัดจาก *C. dendriformis* PW17-134 ในส่วนของ BA มีค่าเท่ากับ $68.415 \pm 0.865 \mu\text{g GAE/mg extract}$ และสารสกัดจาก *T. sanguinea* PP17-18 ในส่วนของ BA มีค่าเท่ากับ $44.201 \pm 0.607 \mu\text{g GAE/mg extract}$ ส่วนสารสกัดในส่วน BE พบปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุดจาก *F. aspera* NP17-02 ($12.000 \pm 0.822 \mu\text{g GAE/mg extract}$) ในขณะที่สารสกัดในส่วน ME พบปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุดจาก *C. dendriformis* PW17-134 ($39.736 \pm 0.499 \mu\text{g GAE/mg extract}$) (ภาพประกอบ 21 และตาราง 13)

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดจำนวน 11 สายพันธุ์ รวม 33 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และพบปริมาณสารประกอบฟีนอลมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของเห็ด และส่วนของเห็ดที่ใช้ในการสกัดสาร เช่น เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ และน้ำเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งชนิดของตัวทำละลายอีกด้วย จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์มีแนวโน้มที่ดีในการศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ นอกเหนือจากการต้านอนุมูลอิสระ เพื่อพัฒนาใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางต่อไป



ภาพประกอบ 21 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ (a) สารสกัดในส่วน BA, (b) สารสกัดในส่วน BE และ (c) สารสกัดในส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-g คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ตาราง 13 คุณสมบัติของสารสกัดจากเห็ดโพลีพออร์ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตทในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

สปีชีส์	รหัส	Antioxidant activities (IC ₅₀ mg/mL)										Total phenolic content					
		DPPH assay				ABTS assay				FIC assay				(µg GAE/mg extract)			
		BA	BE	ME	BA	BE	ME	BA	BE	ME	BA	BE	ME	BA	BE	ME	
<i>Coriopsis dendriformis</i>	PW17-134	0.026 ± 0.002a	1.173 ± 0.047d	1.089 ± 0.101e	0.002 ± 0.001a	1.045 ± 0.021bc	1.415 ± 0.017b	0.903 ± 0.003b	8.534 ± 0.086c	5.994 ± 0.002e	5.994 ± 0.002e	68.415 ± 0.865b	9.484 ± 0.109b	39.736 ± 0.499a			
<i>Cubamyces lactineus</i>	PP17-03	0.453 ± 0.032e	2.931 ± 0.024h	0.866 ± 0.004d	0.237 ± 0.053d	5.626 ± 1.015e	1.261 ± 0.067b	4.104 ± 0.005cd	12.075 ± 0.067g	4.202 ± 0.002d	4.202 ± 0.002d	19.296 ± 0.475e	1.182 ± 0.109e	1.874 ± 0.436f			
<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	0.074 ± 0.004ab	0.351 ± 0.023b	0.362 ± 0.057bc	0.001 ± 0.001a	0.504 ± 0.007ab	1.084 ± 0.003b	1.039 ± 0.083b	5.294 ± 0.03b	1.377 ± 0.017b	1.377 ± 0.017b	45.585 ± 0.865c	12.000 ± 0.822a	2.503 ± 0.288f			
<i>Ganoderma lingzhi</i>	PW17-43	0.212 ± 0.078c	0.344 ± 0.023b	0.451 ± 0.102c	0.046 ± 0.020b	0.277 ± 0.01ab	1.122 ± 0.07b	3.382 ± 0.364c	5.310 ± 0.029b	3.372 ± 0.274c	3.372 ± 0.274c	25.208 ± 0.377d	7.283 ± 0.377c	6.340 ± 0.499e			
<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	1.207 ± 0.003h	1.706 ± 0.009f	2.895 ± 0.004i	0.960 ± 0.014g	3.034 ± 0.296d	3.124 ± 0.163cd	5.81 ± 0.003e	10.558 ± 0.090ef	6.897 ± 0.055gh	6.897 ± 0.055gh	4.327 ± 0.109g	1.308 ± 1.039e	0.302 ± 0.189g			
<i>G. fornicatum</i>	PW17-199	0.462 ± 0.027e	1.001 ± 0.050c	2.805 ± 0.028i	0.116 ± 0.006cd	1.673 ± 0.067c	3.511 ± 0.02d	3.780 ± 0.144cd	9.300 ± 0.217d	7.130 ± 0.010h	7.130 ± 0.010h	21.434 ± 0.327e	7.660 ± 0.189c	7.912 ± 0.398d			
<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	0.325 ± 0.035d	1.248 ± 0.003d	2.492 ± 0.014h	0.102 ± 0.081bc	2.863 ± 0.016d	3.139 ± 0.156cd	3.560 ± 0.354c	9.523 ± 0.070d	6.870 ± 0.022g	6.870 ± 0.022g	19.296 ± 0.786e	5.019 ± 0.680cd	9.547 ± 0.566c			

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ตัวอักษร a-j ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญตามคอลัมน์ โดยผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวก (BHT, Trolox และ EDTA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



4. คุณสมบัติในการต้านการอักเสบของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ด้วยวิธี NO radical scavenging activity

สารสกัดในส่วนของ BA, BE และ ME ของเห็ด 11 สายพันธุ์ได้นำมาศึกษาคุณสมบัติในการต้านการอักเสบด้วยวิธี NO radical scavenging activity โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เนื่องจากไนตริกออกไซด์ เป็นสารตัวกลางในการชักนำให้เกิดการอักเสบ ดังนั้นการวัดคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ได้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการประเมินคุณสมบัติของสารสกัด จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากทุกตัวอย่างมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นกับสายพันธุ์ของเห็ด และตัวทำละลาย (ตาราง 14) โดยสารสกัดในส่วนของ BA พบว่าสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และ *C. dendriformis* PW17-134 มีคุณสมบัติสูงสุด ส่วนสารสกัดที่มีคุณสมบัติรองลงมาได้แก่ *M. vernicipes* PW17-173 และ *T. hirsuta* PW17-41 ซึ่งน้อยกว่าวิตามินซีเท่ากับ 6.8 และ 7.2 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดในส่วนของ BE สารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41 มีคุณสมบัติสูงที่สุดตามด้วย *M. vernicipes* PW17-173, *C. dendriformis* PW17-134 และ *F. aspera* NP17-02 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด จากเส้นใยในส่วน ME พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกับ BA คือสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 มีคุณสมบัติสูงที่สุด ซึ่งไม่ต่างจากวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ *M. vernicipes* PW17-173 และ *T. hirsuta* PW17-41-ตามลำดับ จากผลการทดสอบทั้งหมด พบว่าสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และ *C. dendriformis* PW17-134 มีแนวโน้มในการต้านการอักเสบ ที่ดีที่สุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี NO radical scavenging activity

ตาราง 14 คุณสมบัติด้านการอักเสบของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์เมื่อทดสอบด้วยวิธี NO radical scavenging activity

สปีชีส์	รหัส	Anti-inflammatory (IC ₅₀ mg/mL)		
		สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
		BA	BE	ME
<i>Coriolopsis dendriformis</i>	PW17-134	1.316 ± 0.002ab	2.602 ± 0.030cd	1.574 ± 0.535bc
<i>Cubamycetes lactineus</i>	PP17-03	6.887 ± 0.246f	2.674 ± 0.470cd	5.498 ± 0.291f
<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	1.049 ± 0.021ab	2.779 ± 0.010cd	1.293 ± 0.012a
<i>Ganoderma lingzhi</i>	PW17-43	2.630 ± 0.021cd	2.411 ± 0.012cd	2.110 ± 0.016cd
<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	3.561 ± 0.078de	3.018 ± 0.029d	2.585 ± 0.092d
<i>G. fornicatum</i>	PW17-199	3.386 ± 0.497d	3.798 ± 0.008e	4.560 ± 0.021e
<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	4.635 ± 0.218e	4.978 ± 0.171f	4.492 ± 0.035e
<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	1.967 ± 0.066bc	2.282 ± 0.016c	1.550 ± 0.045bc
<i>M. xanthopus</i>	PP17-16	6.618 ± 1.016f	4.995 ± 0.298f	6.314 ± 0.539g
<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41	2.060 ± 0.452bc	1.333 ± 0.052b	1.727 ± 0.013bc
<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	6.365 ± 0.095f	5.922 ± 0.568g	5.981 ± 0.230fg
Ascorbic acid		0.287 ± 0.002a	0.287 ± 0.002 a	0.287 ± 0.002 a

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษร a-g แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวกวิตามินซี ที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05

5. คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

คุณสมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นอีกคุณสมบัติที่สำคัญ ของสารออกฤทธิ์ในเวชสำอาง ซึ่งผลการทดสอบของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 11 สายพันธุ์แสดงให้เห็นคุณสมบัติของสารสกัดในส่วนต่าง ๆ ของ BA, BE และ ME พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดในส่วน BA ของเห็ด ได้แก่ *T. hirsuta* PW17-41, *F. aspera* NP17-02, *C. dendriformis* PW17-134 และ *G. lingzhi* PW17-43 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.213 ± 0.024 mg/mL, 0.245 ± 0.021 mg/mL, 0.250 ± 0.002 mg/mL และ 0.295 ± 0.008 mg/mL ตามลำดับ (ตาราง 15) เช่นเดียวกับสารสกัด ในส่วน BE ของเห็ด *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 และ *T. hirsuta* PW17-41 ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.649 ± 0.007 mg/mL, 0.677 ± 0.010 mg/mL และ 0.883 ± 0.012 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดส่วน ME ของเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 ($IC_{50} = 0.250 \pm 0.008$ mg/mL), *G. lingzhi* PW17-43 ($IC_{50} = 0.260 \pm 0.019$ mg/mL) และ *F. aspera* NP17-02 ($IC_{50} = 0.345 \pm 0.001$ mg/mL) พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารสกัดต่าง ๆ ของเห็ดโพลีพอร์แสดงคุณสมบัติที่ดี ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว

ตาราง 15 คุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์

สปีชีส์	รหัส	Anti-tyrosinase activity (IC ₅₀ mg/mL)		
		สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
		BA	BE	ME
<i>Coriolopsis dendriformis</i>	PW17-134	0.250 ± 0.005b	0.649 ± 0.007b	0.250 ± 0.008b
<i>Cubamyces lactineus</i>	PP17-03	1.547 ± 0.040g	1.447 ± 0.009e	1.318 ± 0.011k
<i>Funalia aspera</i>	NP17-02	0.245 ± 0.021b	0.677 ± 0.010b	0.345 ± 0.001c
<i>Ganoderma lingzhi</i>	PW17-43	0.295 ± 0.008bc	1.001 ± 0.004c	0.260 ± 0.019b
<i>G. mastoporum</i>	PW17-111	0.527 ± 0.009d	0.965 ± 0.022c	0.577 ± 0.006d
<i>G. fornicatum</i>	PW17-199	0.713 ± 0.029f	1.052 ± 0.033cd	0.784 ± 0.004g
<i>Ganoderma</i> sp.	PP22-01	0.728 ± 0.011f	1.323 ± 0.088de	0.645 ± 0.037f
<i>Microporus vernicipes</i>	PW17-173	0.591 ± 0.013de	1.317 ± 0.025de	1.262 ± 0.013j
<i>M. xanthopus</i>	PP17-16	0.335 ± 0.055c	1.954 ± 0.010f	1.044 ± 0.008i
<i>Trametes hirsuta</i>	PW17-41	0.213 ± 0.024b	0.883 ± 0.012c	0.582 ± 0.010e
<i>T. sanguinea</i>	PP17-18	0.633 ± 0.086ef	2.075 ± 0.029f	0.958 ± 0.002h
Ascorbic acid		0.050 ± 0.002a	0.050 ± 0.002a	0.050 ± 0.002a

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษร a-k แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญตามคอลัมน์ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD กับตัวควบคุมเชิงบวกวิตามินซี ที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05

6. ความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ต่อเซลล์ HaCaT ทดสอบด้วยวิธี MTT assay

จากสารสกัดเห็ดโพลีพอร์จำนวน 11 สายพันธุ์ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตท จำนวน 33 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งแสดงผลการทดสอบในข้อ 3 – 5 พบว่าสารสกัดในส่วน BA, BE และ ME ของเห็ดโพลีพอร์ที่มีคุณสมบัติสูงในทุกคุณสมบัติ ได้แก่ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02, *G. lingzhi* PW17-43, *T. hirsuta* PW17-41, *M. vernicipes* PW17-173 และ *M. xanthopus* PP17-16 รวมทั้งสิ้น 18 ตัวอย่าง ได้คัดเลือกไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เคราติโนไซต์ชนิด HaCaT

6.1 สารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134

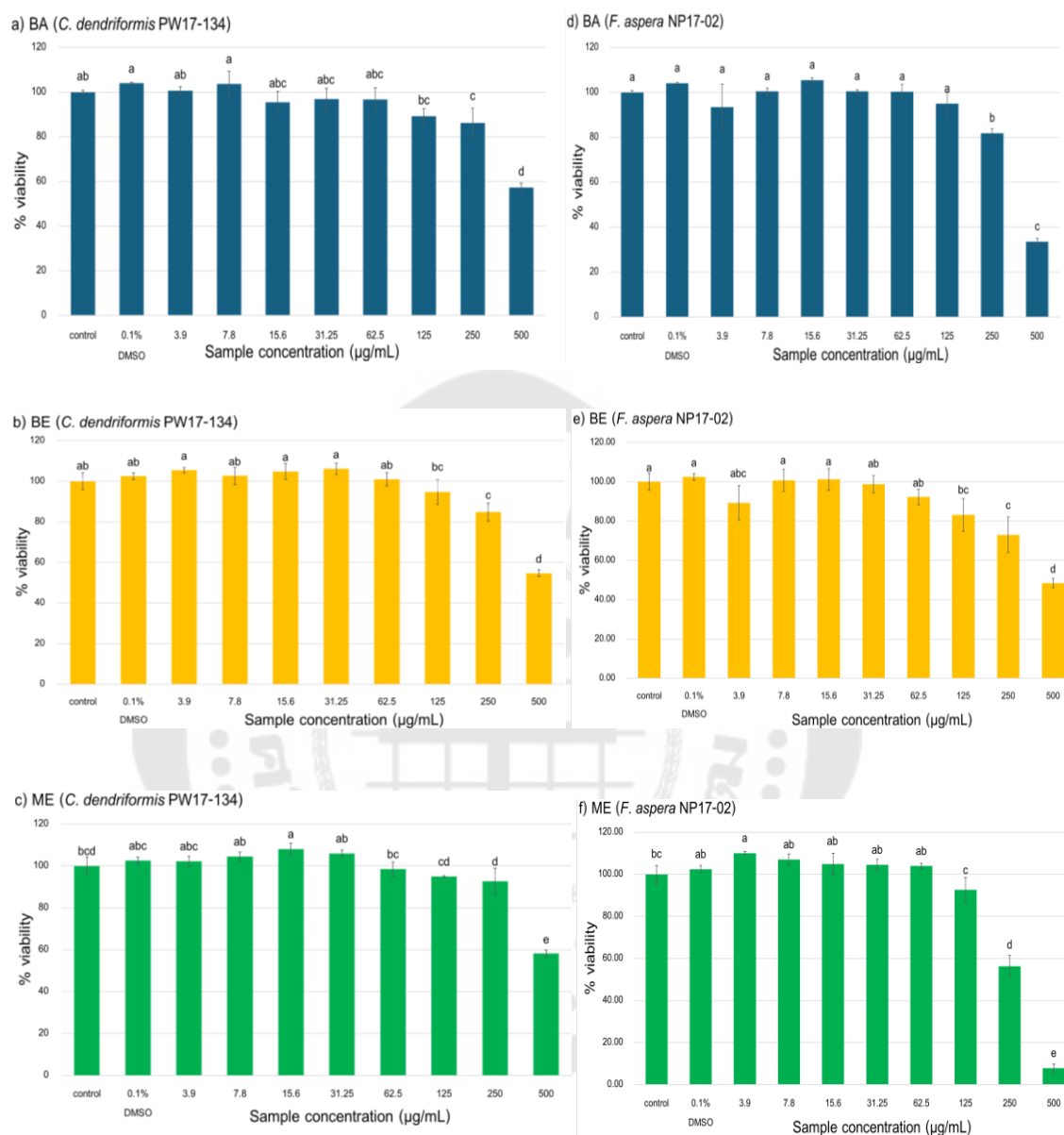
สารสกัดในส่วน BA, BE และ ME ของเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 250 µg/mL ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ โดยมีการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 86.19 (สำหรับ BA), ร้อยละ 84.77 (สำหรับ BE) และ ร้อยละ 92.62 (สำหรับ ME) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดของทั้ง 3 ส่วน ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL มีผลกับการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 54.72 – 58.22 ดังแสดงในภาพประกอบ 22a-c

6.2 สารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02

สารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ BA, BE และ ME ได้นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผลแสดงในภาพประกอบ 22d-f พบว่าสารสกัดในส่วนของ BA เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 3.9 – 125 µg/mL พบว่าไม่มีผลต่อเซลล์ผิวหนัง คือมีการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100 ไม่ต่างจากชุดควบคุม และสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสกัด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 250 µg/mL และ 500 µg/mL พบว่ามีการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 81.85 และ 33.52 ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดในส่วนของ BE พบว่ามีผลต่อเซลล์มากกว่าสารสกัดในส่วน BA คือที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 125 µg/mL พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือร้อยละ 83.09 และลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 250 µg/mL (ร้อยละ 73.02) และ 500 µg/mL (ร้อยละ 48.40) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดในส่วน ME

พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับสารในส่วน BE คือที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 125 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามสารสกัดของ *F. aspera* NP17-02 ในส่วน BA, BE และ ME ที่ความเข้มข้น 3.9 – 250 $\mu\text{g/mL}$ พบว่ามีการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ขึ้นไป





ภาพประกอบ 22 ผลของสารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 และ *F. aspera* NP17-02 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-e คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

6.3 สารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43

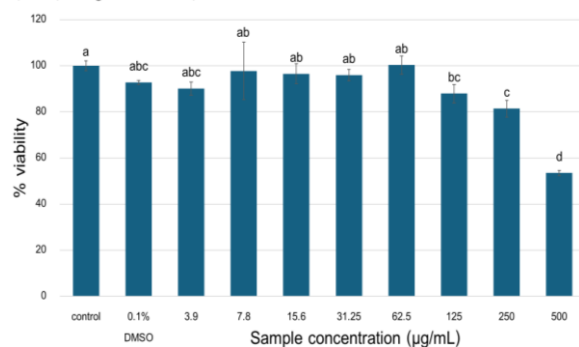
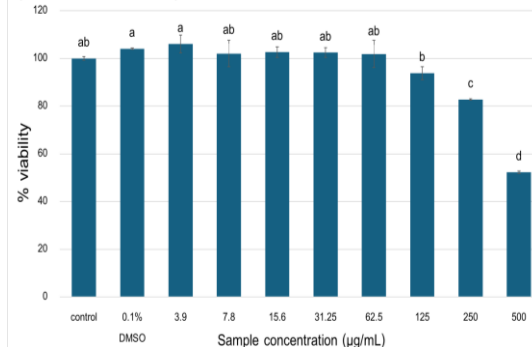
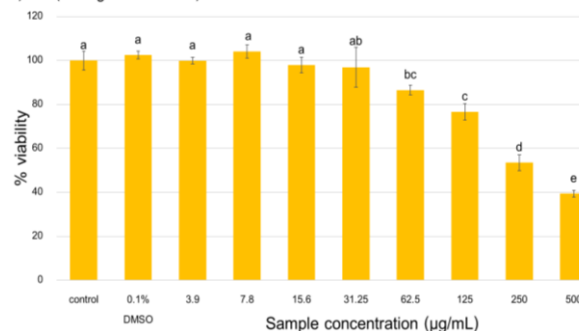
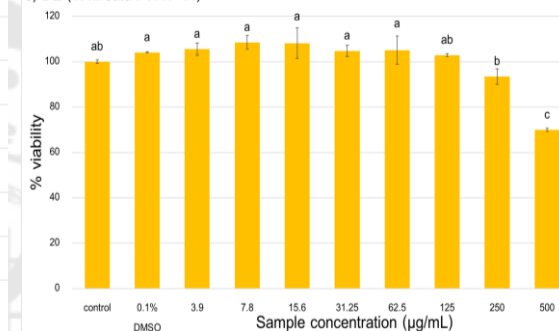
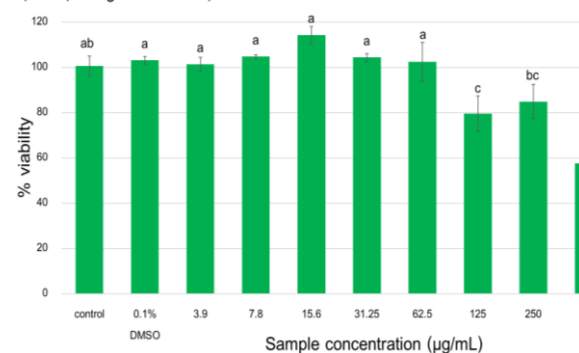
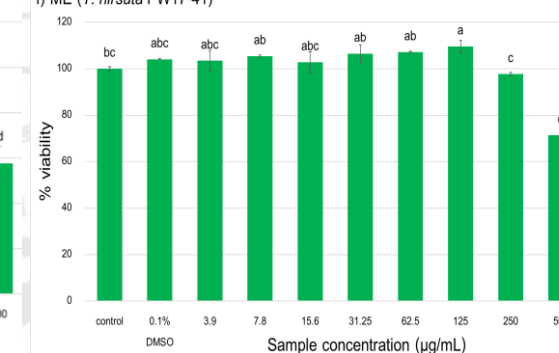
เห็ด *G. lingzhi* เป็นอีกชนิดที่มีรายงานว่ามีความสมบัติและใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอาง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้สกัดสารจากเห็ดที่เพาะเลี้ยงได้พบว่าสารสกัดในส่วน BA ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ พบการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 (ภาพประกอบ 23a-c) แต่สารสกัดในส่วน BE พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารสกัดในส่วน BA คือที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 125 $\mu\text{g/mL}$ ขึ้นไปพบว่ามีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 80 ในขณะที่สารสกัดในส่วน ME ให้ผลไปในแนวทางเดียวกับสารสกัดในส่วน BE คือสารสกัดที่เข้มข้นตั้งแต่ 125 $\mu\text{g/mL}$ ขึ้นไป มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงร้อยละ 39.41 ถึง 57.49 เป็นต้น

6.4 สารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41

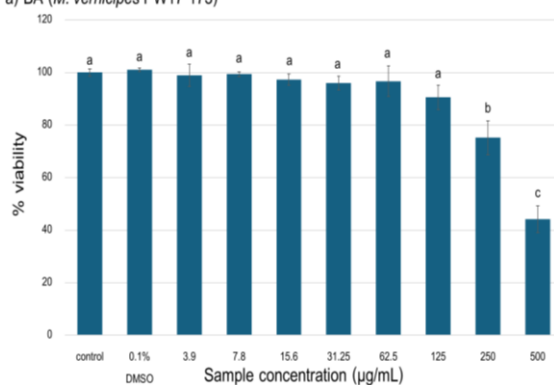
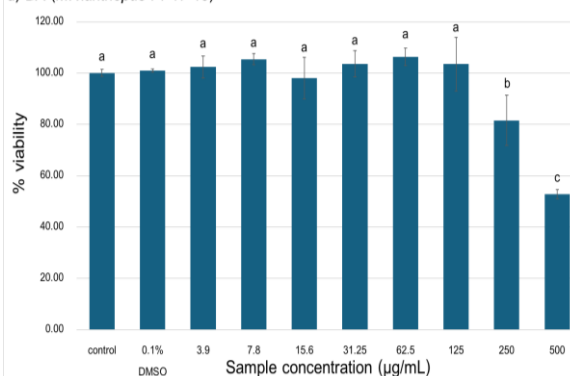
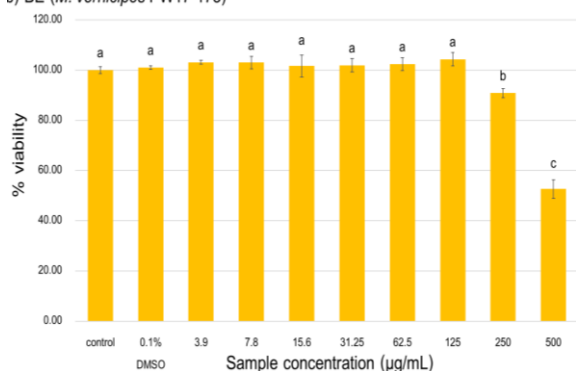
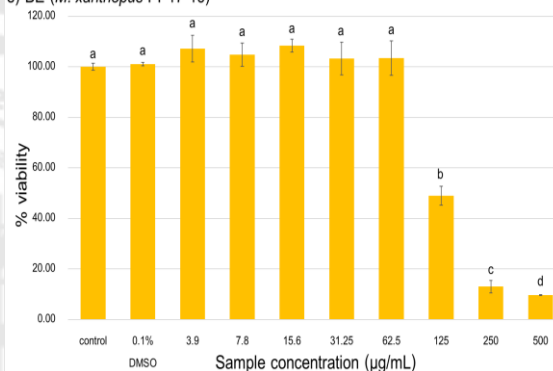
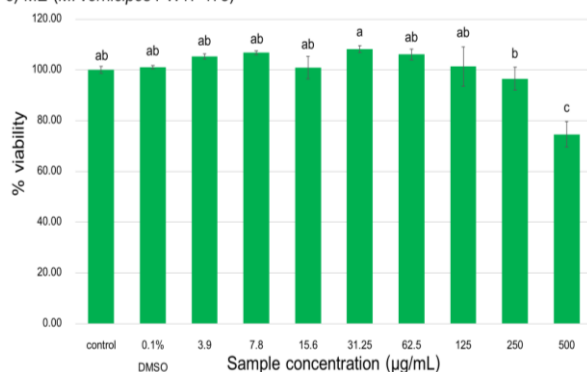
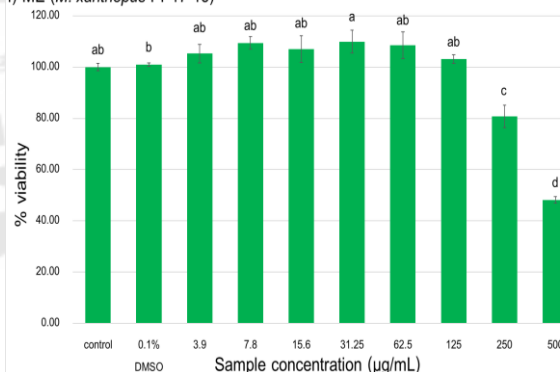
สารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41 เป็นอีกชนิดที่ให้ผลทางเวชสำอางที่ดี โดยสารสกัดในส่วน BA ที่ความเข้มข้น 3.9 – 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 125 – 250 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 93.85 – 82.81 ในขณะที่สารสกัดส่วน BE ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ และ 500 $\mu\text{g/mL}$ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 93.48 และ 69.93 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด ME พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 250 $\mu\text{g/mL}$ เซลล์ยังมีการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 97.70 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเท่ากับ 500 $\mu\text{g/mL}$ ยังพบการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 70 (ภาพประกอบ 23d-f)

6.5 สารสกัดจากเห็ด *M. vernicipes* PW17-173

สารสกัดของเห็ด *M. vernicipes* PW17-173 แม้ว่าจะไม่ได้มีคุณสมบัติทางเวชสำอางที่ทดสอบสูงสุด แต่มีผลอยู่ในเกณฑ์ที่ดีและมีการศึกษาสารสกัดของเห็ดสกุลนี้โดยสารสกัดในส่วน BE และ ME ที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/mL}$ พบว่าส่งผลกับการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ในขณะที่สารสกัดส่วน BA ที่ความเข้มข้นเดียวกันส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเท่ากับร้อยละ 75.18 (ภาพประกอบ 24a-c) ทั้งนี้ที่ความเข้มข้นของสารสกัดในส่วน BA, BE และ ME ที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 44.20, 52.65 และ 74.63 ตามลำดับ

a) BA (*G. lingzhi* PW17-43)d) BA (*T. hirsuta* PW17-41)b) BE (*G. lingzhi* PW17-43)e) BE (*T. hirsuta* PW17-41)c) ME (*G. lingzhi* PW17-43)f) ME (*T. hirsuta* PW17-41)

ภาพประกอบ 23 ผลของสารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 และ *T. hirsuta* PW17-41 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-e คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

a) BA (*M. vernicipes* PW17-173)d) BA (*M. xanthopus* PP17-16)b) BE (*M. vernicipes* PW17-173)e) BE (*M. xanthopus* PP17-16)c) ME (*M. vernicipes* PW17-173)f) ME (*M. xanthopus* PP17-16)

ภาพประกอบ 24 ผลของสารสกัดจากเห็ด *M. vernicipes* PW17-173 และ *M. xanthopus* PP17-16 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซด์ HaCaT (a, d) สารสกัดจากส่วน BA, (b, e) สารสกัดจากส่วน BE และ (c, f) สารสกัดจากส่วน ME เมื่ออักษรภาษาอังกฤษ a-d คือ ผลทางสถิติโดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

6.6 สารสกัดจากเห็ด *M. xanthopus* PP17-16

สารสกัดจากเห็ด *M. xanthopus* PP17-16 ส่วนต่าง ๆ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์แตกต่างกัน โดยสารสกัดในส่วน BE มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มากที่สุดคือที่ความเข้มข้น 125 µg/mL พบว่าเซลล์มีการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 48.97 ในขณะที่ความเข้มข้นของสาร 3.9 – 62.5 µg/mL แสดงการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 100 ไม่ต่างจากชุดควบคุม ส่วนสารสกัดในส่วน BA และ ME ที่ความเข้มข้น 250 µg/mL พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ส่วนความเข้มข้นที่ 500 µg/mL พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์เหลือเพียงร้อยละ 52.83 ถึง 48.18 เท่านั้น (ภาพประกอบ 23d-f)

7. การวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ด้วยวิธี Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS)

จากข้อมูลของสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ที่ทดสอบคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ การอักเสบ และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส รวมทั้งผลของสารสกัดต่อการรอดชีวิตของเซลล์เคราตินไนไซต์ ได้คัดเลือกสารสกัดของเห็ดจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. dendroformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 และ *G. lingzhi* PW17-43 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตต ในส่วนของ BE และ BA รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง ได้นำมาวิเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทั้งหมดแบบไม่จำเพาะด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยสารสกัดในส่วน BA ได้วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ชนิด C18 และสารสกัดในส่วน BE ได้วิเคราะห์ผ่านคอลัมน์ชนิดเอไมด์ (amide) โดยวิเคราะห์ทั้งโหมดไอออนบวก (pos: positive ion mode) และโหมดไอออนลบ (neg: negative ion mode) ข้อมูลสารเมแทบอไลต์ที่ได้สามารถแจกแจงได้ตามสายพันธุ์เห็ดดังนี้

7.1 สารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134

ผลการวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA และ BE พบสารจำนวนไม่น้อยกว่า 2,299 และ 1,058 ชนิด ตามลำดับ ส่วนใหญ่จัดเป็นสารในกลุ่ม alkaloids and derivatives, amino acid, phenolic compounds /benzenoids and derivatives, carbohydrates, lipids and lipid-like molecules, nucleosides, nucleotides and analogues, organic acid และ phenylpropanoids and polyketides

ทั้งนี้พบสารที่ยังไม่ได้ระบุชนิดได้ในสารสกัดส่วน BA สูงถึง 1,715 ชนิด และในสารสกัดส่วน BE เท่ากับ 702 ชนิด (ตาราง 16)

ตาราง 16 กลุ่มสารเมแทบอลิต์ที่พบในสารสกัดเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	จำนวนสารเมแทบอลิต์ของ <i>C. dendriformis</i> PW17-134	
	Ethyl acetate extract (BA)	Ethanol extract (BE)
Alkaloids and derivatives	11	12
Organic acid	195	164
Amino acid	108	98
Carbohydrates	3	2
Lipids and lipid-like molecules	86	22
Nucleosides, nucleotides, and analogues	14	10
Phenolic compound /Benzenoids and Derivatives	142	46
Phenylpropanoids and polyketides	25	2
NA	1715	702

หมายเหตุ: NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BA

จากสารเมแทบอลิต์จำนวนมาก ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดและมีสรรพคุณทางเวชสำอาง ทั้งชนิดที่มีไฮดรอกซิลและไฮดรอกซิบวก จำนวน 40 ชนิด แสดงในตาราง 17 ซึ่งพบว่าสารไฮดรอกซิลที่พบมาก ได้แก่ 4-Hydroxybenzaldehyde (-), Cyclo(tyrosyl-prolyl) (-), 4-Dodecylbenzenesulfonic acid (-), Benzoic acid (-), Imidazoleacetic acid (-), Uracil (-), Dodecyl sulfate (-), 3,4-dihydroxybenzoate (-), Salsolinol (-), Oxypurinol (-), DL-Lactic Acid (-), N-acetyltyramine (-), 3-Allyl-2-hydroxybenzoic acid (-), Indole-2-carboxylic acid (-), 2-(acetylamino)-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid (-), 4-Hydroxybenzoic acid (-), Succinate (-) และ Myristyl sulfate (-) ส่วนสารไฮดรอกซิบวกที่พบ ได้แก่ N-benzyl-N,3,5-trimethylisoxazole (+), 4-carboxamide (+), Pyridoxamine (+), Nicotinic acid (+), Cyclo(leucylprolyl) (+), 6-Quinolinecarboxylic acid (+), 4-Aminophenol (+), Ritalinic acid (+), Nikethamide 1-oxide (+), Thymine (+), Benzathine (+), 3-Hydroxy-2-methylpyridine (+), Acetophenone (+), 3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (+), 1-(3-Methylbenzyl)piperazine (+), Indole-3-carboxaldehyde (+), 5-Methoxy AMT (+), N,N-dimethyl-9H-purin-6-amine (+), 2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-yl-Butan-1-One (+), d-Valerolactam (+), 2-ethyl-2-(3-methoxyphenyl)cyclohexanone oxime (+), 2-Aminoindan-2-carboxylic acid และ 2-Hydroxycinnamic acid (+)

ตาราง 17 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
4-Hydroxybenzaldehyde	Carbonyl compounds	$C_7H_6O_2$	neg	antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity ⁽⁶⁹⁾
Cyclo(tyrosyl-prolyl)	NA	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	neg	collagen stimulation ⁽⁷⁰⁾
4Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
Benzoic acid	Benzene and	$C_7H_6O_2$	neg	moisture,

	derivatives			antiaging ⁽⁷²⁾
Imidazoleacetic acid	Imidazoles	$C_5H_6N_2O_2$	neg	antioxidants, anti-inflammatory ⁽⁷³⁾
Uracil	Pyrimidines and pyrimidine derivatives	$C_4H_4N_2O_2$	neg/pos	-
Dodecyl sulfate	Polyketides	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
3,4-Dihydroxybenzoate	NA	$C_7H_6O_4$	neg	antioxidant, anti- inflammatory, anti- tyrosinase ⁽⁷⁵⁾
Salsolinol	Tetrahydroisoquinolines	$C_{10}H_{13}NO_2$	neg	antioxidants ⁽⁷⁶⁾
Oxypurinol	Purines and derivatives	$C_5H_4N_4O_2$	neg	antioxidants ⁽⁷⁷⁾
DL-Lactic Acid	Organic acids	$C_3H_6O_3$	neg	exfoliation, moisture, collagen stimulation ⁽⁷⁸⁾
N-Acetyltyramine	NA	$C_{10}H_{13}NO_2$	neg	-
3-Allyl-2-hydroxybenzoic acid	NA	$C_{10}H_{10}O_3$	neg	derivative of salicylic acid ⁽⁷⁹⁾
Indole-2-carboxylic acid	Indole and derivatives	$C_9H_7NO_2$	neg	-
2-(Acetylamino)-3-(1H- indol-3-yl)propanoic acid	NA	$C_{13}H_{14}N_2O_3$	neg	-
4-Hydroxybenzoic acid	Benzene and derivatives	$C_7H_6O_3$	neg	antioxidant, antimicrobial, anti- inflammatory, UVB protection ⁽⁸⁰⁾
Succinate	Organic acids	$C_4H_6O_4$	neg	antioxidants, anti-inflammatory ⁽⁸¹⁾
Myristyl sulfate	Organic acids	$C_{14}H_{30}O_4S$	neg	surfactant, cleaning agent ⁽⁸²⁾
N-benzyl-N,3,5- trimethylisoxazole-4- carboxamide	NA	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	pos	-
Pyridoxamine	Amines and derivatives	$C_8H_{12}N_2O_2$	pos	vitamin B6 derivative, anti-

				aging, anti-inflammatory ⁽⁸³⁾
Nicotinic acid	Pyridine and derivatives	$C_6H_5NO_2$	pos	antiaging, antioxidants ⁽⁸⁴⁾
Cyclo(leucylprolyl)	NA	$C_{11}H_{18}N_2O_2$	pos	-
6-Quinolinecarboxylic acid	NA	$C_{10}H_7NO_2$	pos	-
4-Aminophenol	Benzene and derivatives	C_6H_7NO	pos	-
Ritalinic acid	NA	$C_{13}H_{17}NO_2$	pos	-
Nikethamide 1-oxide	NA	$C_{10}H_{14}N_2O_2$	pos	-
Thymine	Pyrimidines and pyrimidine derivatives	$C_5H_6N_2O_2$	pos	anti-inflammatory ⁽⁸⁵⁾
Benzathine	NA	$C_{16}H_{20}N_2$	pos	-
3-Hydroxy-2-methylpyridine	NA	C_6H_7NO	pos	-
Acetophenone	Carbonyl compounds	C_8H_8O	pos	antioxidant, anti-inflammatory, antifungal, antibacterial, antiviral activities ⁽⁸⁶⁾
3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	NA	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	pos	-
Methylbenzyl)piperazine	NA	$C_{12}H_{18}N_2$	pos	-
Indole-3-carboxaldehyde	Indoles	C_9H_7NO	pos	-
5-Methoxy AMT	NA	$C_{12}H_{16}N_2O$	pos	-
N,N-dimethyl-9H-purin-6-amine	NA	$C_7H_9N_5$	pos	-
2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-Yl-Butanone	NA	$C_{10}H_{18}O_2$	pos	-
d-Valerolactam	Piperidinones	C_5H_9NO	pos	-
2-Ethyl-2-(3-	NA	$C_{15}H_{21}NO_2$	pos	-

methoxyphenyl)cyclohexa

noneoxime

2-Aminoindan-2-carboxylic acid	NA	$C_{10}H_{11}NO_2$	pos	amino acid derivative ⁽⁸⁷⁾
2-Hydroxycinnamic acid	Polyketides	$C_9H_8O_3$	pos	antioxidants, anti-collagenase, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-tyrosinase ⁽⁸⁸⁾

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอลิต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร, NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BE

จากสารเมแทบอลิต์จำนวนมาก ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดและมีสรรพคุณทางเวชสำอาง ทั้งชนิดที่มีไอออนลบและประจุบวกจำนวน 31 ชนิด แสดงในตาราง 18 ซึ่งพบว่าสารไอออนลบที่พบมากได้แก่ 4-Dodecylbenzenesulfonic acid (-), Stearic acid (-), Allantoin (-), Glyoxylic acid (-), Hypoxanthine (-), L-(+)-Lactic acid (-), Dodecyl sulfate (-), Xanthine (-), L-allo-Threonine (-), N-Acetyl-L-aspartic acid (-), Gluconic acid (-), Galacturonic acid (-), Ferulic acid (-), 9-(3-O-Methylpentofuranosyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (-), Ethyl myristate (-), Itaconic acid (-), N-Acetyl-L-glutamate (-), d-Gluconic acid d-lactone (-) และ 2-Oxoglutaric acid (-) ส่วนสารไอออนบวกที่พบได้แก่ Choline (+), Morpholine-4-carboximidamide hydrobromide (+), Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol (+), DL-Carnitine (+), L-(+)-Citrulline (+), d-Valerolactam (+), Erucamide (+), Sphinganine (+), Methyl 3-(methylthio)propionate (+), Pilocarpine (+), 2,6-Diaminotoluene (+) และ Norharman (+)

ตาราง 18 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
4-Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and substituted derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
Stearic acid	Fatty Acyls	$C_{18}H_{36}O_2$	neg	moisture ⁽⁸⁹⁾
Allantoin	Azoles	$C_4H_6N_4O_3$	neg	moisture, wound healing ⁽⁹⁰⁾
Glyoxylic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_2H_2O_3$	neg	antiwrinkles, antiaging, moisture ⁽⁹¹⁾
Hypoxanthine	Imidazopyrimidines	$C_5H_4N_4O$	neg	antioxidant ⁽⁹²⁾
L-(+)-Lactic acid	Organic acids	$C_3H_6O_3$	neg	exfoliation, moisture, collagen stimulation ⁽⁷⁸⁾
Dodecyl sulfate	Polyketides	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
Xanthine	Imidazopyrimidines	$C_5H_4N_4O_2$	neg	anti-inflammatory ⁽⁹³⁾
L-Allo-threonine	Carboxylic acids and derivatives	$C_4H_9NO_3$	neg	-
N-Acetyl-L-aspartic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_6H_9NO_5$	neg	antioxidant ⁽⁹⁴⁾
Gluconic acid	Organooxygen compounds	$C_6H_{12}O_7$	neg	surfactant ⁽⁹⁵⁾
Galacturonic acid	Organooxygen compounds	$C_6H_{10}O_7$	neg	surfactant ⁽⁹⁶⁾
Ferulic acid	Cinnamic acids and derivatives	$C_{10}H_{10}O_4$	neg	-
9-(3-O-Methylpentofuranosyl)-1,9-dihydro-6H-purin-one	NA	$C_{11}H_{14}N_4O_5$	neg	-
Ethyl myristate	Fatty Acyls	$C_{16}H_{32}O_2$	neg	moisture, anticaking, surfactant ⁽⁹⁷⁾
Itaconic acid	Fatty Acyls	$C_5H_6O_4$	neg	antioxidant ⁽⁹⁸⁾

N-Acetyl-L-glutamate	Carboxylic acids and derivatives	$C_7H_{11}NO_5$	neg	antioxidant ⁽⁹⁹⁾
d-Gluconic acid d-lactone	Organooxygen compounds	$C_6H_{10}O_6$	neg	antioxidant ⁽¹⁰⁰⁾
2-Oxoglutaric acid	Keto acids and derivatives	$C_5H_6O_5$	neg	-
Choline	Organonitrogen compounds	$C_5H_{13}NO$	pos	-
Morpholine-4-carboximidamide hydrobromide	NA	$C_5H_{11}N_3O$	pos	-
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	NA	$C_{24}H_{30}O_6$	pos	-
DL-Carnitine	NA	$C_7H_{15}NO_3$	pos	-
L-(+)-Citrulline	NA	$C_6H_{13}N_3O_3$	pos	-
d-Valerolactam	Piperidines	C_5H_9NO	pos	-
Erucamide	NA	$C_{22}H_{43}NO$	pos	-
Sphinganine	Organonitrogen compounds	$C_{18}H_{39}NO_2$	pos	anti-inflammatory, antimicrobial ⁽¹⁰¹⁾
Methyl 3-(methylthio)propionate	Carboxylic acids and derivatives	$C_5H_{10}O_2S$	pos	-
Pilocarpine	ND	$C_{11}H_{16}N_2O_2$	pos	-
2,6-Diaminotoluene	Benzene and substituted derivatives	$C_7H_{10}N_2$	pos	-
Norharman	Indoles and derivatives	$C_{11}H_8N_2$	pos	-

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอไลต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร, NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

7.2 สารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02

ผลการวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA และ BE พบสารจำนวนไม่น้อยกว่า 2,304 และ 933 ชนิด ตามลำดับ จัดเป็นสารในกลุ่ม alkaloids and derivatives, amino acid, phenolic compounds /benzenoids and derivatives, carbohydrates, lipids and lipid-like molecules, nucleosides, nucleotides and analogues, organic acid และ phenylpropanoids and polyketides นอกจากนี้ยังพบสารที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ถึง 1,713 ชนิด สำหรับสารในส่วน BA และ 588 ชนิด สำหรับสารในส่วน BE (ตาราง 19)

ตาราง 19 กลุ่มสารเมแทบอลิต์ที่พบในสารสกัดเห็ด *F. aspera* NP17-02 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	จำนวนสารเมแทบอลิต์ของ <i>F. aspera</i> NP17-02	
	Ethyl acetate extract (BA)	Ethanol extract
Alkaloids and derivatives	9	3
Amino acid	98	97
Phenolic compound /Benzenoids and Derivatives	152	49
Carbohydrates	3	3
Lipids and lipid-like molecules	86	28
Nucleosides, nucleotides, and Analogues	54	33
Organic acids	158	129
Phenylpropanoids and polyketides	31	3
NA	1713	588

หมายเหตุ: NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BA

จากสารเมแทบอลิต์ทั้งหมด ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดและมีสรรพคุณทางเวชสำอางทั้งชนิดที่พบในโหมดไฮออนลบและไฮออนบวก จำนวน 36 ชนิด แสดงในตาราง 20 ซึ่งพบว่าสารประจุลบที่พบมาก ได้แก่ Propyl gallate (-), Dodecyl sulfate (-), Vanillin (-), Adenosine (-), 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid (-), 3,4-Dihydroxybenzoate (-), Myristyl sulfate (-), DL-Lactic acid (-), Phenyllactic acid (-), Succinate (-), 4-Hydroxybenzaldehyde (-), Methyl 4-

hydroxyphenylacetate (-), Imidazoleacetic acid (-) และ Uridine (-) ส่วนไฮดรอกซีเบนซอิกที่พบ ได้แก่ Nicotinic acid (+), 6-Quinolinecarboxylic acid (+), Meconin (+), Methyl isonicotinate (+), Pyridoxamine (+), 4-Aminophenol (+), Norharman (+), Nicotinamide (+), N-benzyl-N,3,5-trimethylisoxazole-4-carboxamide (+), 2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-Yl-Butan-1-One (+), 4,4'-Bis(diethylamino)benzophenone (+), 2'-O-Methyladenosine, Betaine (+), 1-Methyladenosine (+), Betaine (+), 1-Methyladenosine (+), L-Valine (+) และ Esculetin (+)

ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ยับยั้งจุลินทรีย์ ชะลอวัย เพิ่มความชุ่มชื้น และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นต้น สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพทางเวชสำอางในผลการทดลองก่อนหน้า

ตาราง 20 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
Propyl gallate	Benzene and derivatives	$C_{10}H_{12}O_5$	neg	antioxidants ⁽¹⁰²⁾
4-Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
Dodecyl sulfate	Polyketides	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
Vanillin	Phenols and derivatives	$C_8H_8O_3$	neg	antioxidants ⁽¹⁰³⁾
Adenosine	Purines and derivatives	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	neg/pos	anti-inflammatory, antiaging ⁽¹⁰⁴⁾
3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	Phenylpropanoic acids	$C_9H_{10}O_3$	neg	antiaging ⁽¹⁰⁵⁾
3,4-Dihydroxybenzoate	NA	$C_7H_6O_4$	neg	antioxidant, anti-inflammatory, anti-tyrosinase ⁽⁷⁵⁾
Uracil	Pyrimidines and pyrimidine	$C_4H_4N_2O_2$	neg/pos	-

	derivatives				
Myristyl sulfate	Organic acids	$C_{14}H_{30}O_4S$	neg	surfactant, cleaning agent ⁽⁸²⁾	
DL-Lactic Acid	Organic acids	$C_3H_6O_3$	neg	exfoliation, moisture, collagen stimulation ⁽⁷⁸⁾	
Phenyllactic acid	Organic acids	$C_9H_{10}O_3$	neg	Lactic acid derivatives ⁽⁷⁹⁾	
Succinate	Organic acids	$C_4H_6O_4$	neg	antioxidants, - anti- inflammatory ⁽⁸¹⁾	
4-Hydroxybenzaldehyde	Carbonyl compounds	$C_7H_6O_2$	neg	antioxidant, anti- inflammatory, antimicrobial activity ⁽⁶⁹⁾	
Methyl 4- hydroxyphenylacetate	NA	$C_9H_{10}O_3$	neg	used in various industries, including fragrance and cosmetic industry ⁽¹⁰⁶⁾	
N-Isovalerylglycine	Amino acids, peptides, and analogues	$C_7H_{13}NO_3$	neg	-	
3-Hydroxy-3- methylbutanoic acid	Fatty acyls	$C_5H_{10}O_3$	neg	-	
Imidazoleacetic acid	Imidazoles	$C_5H_6N_2O_2$	neg	antioxidants, anti- inflammatory ⁽⁷³⁾	
Tetramethylene glutarimide	NA	$C_9H_{13}NO_2$	neg	-	
Phenyl phosphate	Organic acids	$C_6H_7O_4P$	neg	-	
Uridine	Nucleic acids and analogues	$C_9H_{12}N_2O_6$	neg	antiaging ⁽¹⁰⁷⁾	

Nicotinic acid	Pyridine and derivatives	$C_6H_5NO_2$	Pos	antiaging, antioxidants ⁽⁸⁴⁾
6-Quinolincarboxylic acid	NA	$C_{10}H_7NO_2$	Pos	-
Meconin	Isobenzofuranones	$C_{10}H_{10}O_4$	pos	-
Methyl isonicotinate	NA	$C_7H_7NO_2$	pos	-
Pyridoxamine	Amines and derivatives	$C_8H_{12}N_2O_2$	pos	vitamin B6 derivative, anti-inflammatory ⁽⁸³⁾
4-Aminophenol	Benzene and derivatives	C_6H_7NO	pos	-
Norharman	Indole and derivatives	$C_{11}H_8N_2$	pos	antioxidants, anti-inflammatory ⁽¹⁰⁸⁾
Nicotinamide	Pyridine and derivatives	$C_6H_6N_2O$	pos	boost hydration ⁽¹⁰⁹⁾
N-benzyl-N,3,5-trimethylisoxazole-4-carboxamide	NA	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	pos	-
2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-Yl-Butan-1-One	NA	$C_{10}H_{18}O_2$	pos	-
4,4'-Bis(diethylamino)benzophenone	NA	$C_{21}H_{28}N_2O$	pos	-
2'-O-Methyladenosine	NA	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	pos	-
Betaine	NA	$C_5H_{11}NO_2$	pos	moisture, antioxidants ⁽¹¹⁰⁾
1-Methyladenosine	Purines and derivatives	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	pos	-
L-Valine	Amino acids	$C_5H_{11}NO_2$	pos	amino acid, moisture ⁽¹¹¹⁾
Esculetin	Coumarins and derivatives	$C_9H_6O_4$	pos	antioxidants, anti-inflammatory,

antifungal,
antibacterial,
antiviral⁽¹¹²⁾

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอลิต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร, NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BE

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BE ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดจาก *F. aspera* NP17-02 และมีสรรพคุณทางเวชสำอาง ทั้งชนิดที่มีไอออนลบและไอออนบวกจำนวน 17 ชนิด แสดงในตาราง 21 ซึ่งพบว่าสารไอออนลบที่พบมาก ได้แก่ Propyl gallate (-), 4-Dodecylbenzenesulfonic acid (-), Dodecyl sulfate (-), Vanillin (-), Glyoxylic acid (-), Stearic acid (-), 1,5-Anhydro-D-glucitol (-), 3-Methylglutaric acid (-), 2,6-Pyridinecarboxylic acid (-), N-Acetyl-L-glutamine (-), Hypoxanthine (-) และ N-Acetyl-L-aspartic acid (-) ส่วนสารไอออนบวกที่พบ ได้แก่ Methionine sulfoxide (+), d-Valerolactam (+), N3,N4-Dimethyl-L-arginine (+) และ Nicotinate (+)

ตาราง 21 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
Propyl gallate	Benzene and derivatives	$C_{10}H_{12}O_5$	neg	antioxidants ⁽¹⁰²⁾
4-Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
Dodecyl sulfate	Polyketides	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
Vanillin	Phenols and derivatives	$C_8H_8O_3$	neg	antioxidants ⁽¹⁰³⁾
Glyoxylic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_2H_2O_3$	neg	antiwrinkles, antiaging, moisture ⁽⁹¹⁾

Stearic acid	Fatty Acyls	$C_{18}H_{36}O_2$	neg	moisture ⁽⁸⁹⁾
1,5-Anhydro-D-glucitol	Organooxygen compounds	$C_6H_{12}O_5$	neg	antidiabetic ⁽¹¹³⁾
3-Methylglutaric acid	Fatty Acyls	$C_6H_{10}O_4$	neg	antioxidants ⁽¹¹⁴⁾
2,6-Pyridinecarboxylic acid	Pyridines and derivatives	$C_7H_5NO_4$	neg	antimicrobial ⁽¹¹⁵⁾
N-Acetyl-L-glutamine	NA	$C_7H_{12}N_2O_4$	neg	-
Hypoxanthine	Imidazopyrimidines	$C_5H_4N_4O$	neg	antioxidants ⁽⁹²⁾
N-Acetyl-L-aspartic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_6H_9NO_5$	neg	antioxidants ⁽⁹⁴⁾
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	NA	$C_{24}H_{30}O_6$	pos	-
Methionine sulfoxide	Carboxylic acids and derivatives	$C_5H_{11}NO_3S$	pos	antioxidants ⁽¹¹⁶⁾
d-Valerolactam	Piperidines	C_5H_9NO	pos	antibacterial ⁽¹¹⁷⁾
N3,N4-Dimethyl-L-arginine	Carboxylic acids and derivatives	$C_8H_{18}N_4O_2$	pos	anti-inflammatory ⁽¹¹⁸⁾
Nicotinate	Pyridines and derivatives	$C_6H_5NO_2$	pos	antiaging , antioxidant ⁽¹¹⁹⁾

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอลิต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร, NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

7.3 สารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43

ผลการวิเคราะห์ชนิดสารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA และ BE พบสารจำนวนไม่น้อยกว่า 2,314 และ 595 ชนิด ตามลำดับ จัดเป็นสารในกลุ่ม alkaloids and derivatives, amino acid, phenolic, compounds /benzenoids and derivatives, carbohydrates, lipids and lipid-like molecules, nucleosides, nucleotides and analogues, organic acid และ phenylpropanoids and polyketides นอกจากนี้ยังพบสารที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ถึง 1,687 ชนิด สำหรับสารในส่วน BA และ 363 ชนิด สำหรับสารในส่วน BE (ตาราง 22)

ตาราง 22 กลุ่มสารเมแทบอลิต์ที่พบในสารสกัดเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	จำนวนสารเมแทบอลิต์ของ <i>G. lingzhi</i> PW17-43	
	Ethyl acetate extract (BA)	Ethanolic extract (BE)
Alkaloids and derivatives	10	1
Organic acid	2	13
Amino acid	2	3
Carbohydrates	101	30
Lipids and lipid-like molecules	10	5
Nucleosides, nucleotides, and analogues	312	145
Phenolic compound /Benzenoids and Derivatives	162	33
Phenylpropanoids and polyketides	28	2
NA	1687	363

หมายเหตุ: NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BA

จากสารเมแทบอลิต์จำนวนมาก ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดและมีสรรพคุณทางเวชสำอาง ทั้งชนิดที่มีไฮดรอกซิลและไฮดรอกซิบวก จำนวน 38 ชนิด แสดงในตาราง 23 ซึ่งพบว่าสารไฮดรอกซิลที่พบมาก ได้แก่ 5-Hydroxyindole-3-acetic acid (-), 2,5-Dihydroxybenzoate (-), 4-Dodecylbenzenesulfonic acid (-), Ethyl 2-(3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-2-yl)acetate (-), Dodecyl sulfate (-), 3-Methyladipic acid (-), Imidazoleacetic acid (-), Methylsuccinic acid (-), Ethyl 3-[(1-benzyl-4-piperidyl)amino]-2-cyanoacrylate (-), 5-Methoxyindole (-), 4-Hydroxybenzaldehyde (-), Myristyl sulfate (-), 2',4',6'-Trihydroxydihydroch (-), Spiculisporic acid (-), 2-Benzothiazolesulfonic acid (-), 3-hydroxy-2-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-3-(methoxycarbonyl)pentanedioic acid (-), 4-Hydroxy-2-(2-hydroxyethyl)-1,2-dihydrophthalazin-1-one (-), 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzothiazepine-4-thione (-), 4-Acetamidobutanoic acid (-) และ Pantothenic acid (-) ส่วนสารไฮดรอกซิบวกที่พบ ได้แก่ Methyl isonicotinate (+), Mesalamine (+), Nicotinic acid (+), Pyridoxamine (+), 6-Quinolinecarboxylic acid (+), 2-(2-Hydroxypropyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (+), Methylimidazoleacetic acid (+), 4-

(Diethylamino)salicylaldehyde (+), 2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-Yl-Butan-1-One (+), 3-(Propan-2-yl)-octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione (+), Cyclohexanecarboxylic acid (+), Dethiobiotin (+), Dimethachlor OXA (+), Pantothenic acid (+), Ethyl 2-(5-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)acetate (+), 4-Acetamidobutanoic acid (+), 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (+), Dipropylene glycol dimethyl ether (+) และ Cyclo(phenylalanyl-prolyl) (+)

ตาราง 23 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA จากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	Indole and derivatives	$C_{10}H_9NO_3$	neg	-
2,5-dihydroxybenzoate	NA	$C_7H_6O_4$	neg	-
4-Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
Ethyl 2-(3-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-2-yl)acetate	NA	$C_{12}H_{13}NO_2S$ 2	neg	-
Dodecyl sulfate	Polyketides[PK]	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
3-Methyladipic acid	NA	$C_7H_{12}O_4$	neg	-
Imidazoleacetic acid	Imidazoles	$C_5H_6N_2O_2$	neg	antioxidant, anti-inflammatory ⁽⁷³⁾
Methylsuccinic acid	Fatty acyls[FA]	$C_5H_8O_4$	neg	-
Ethyl 3-[(1-benzyl-4-piperidyl)amino]-2-cyanoacrylate	NA	$C_{18}H_{23}N_3O_2$	neg	-
5-Methoxyindole	NA	C_9H_9NO	neg	-
4-Hydroxybenzaldehyde	Carbonyl compounds	$C_7H_6O_2$	neg	-
Myristyl sulfate	Organic acids	$C_{14}H_{30}O_4S$	neg	-
2',4',6'Trihydroxydihydroch	NA	$C_{15}H_{14}O_4$	neg	-

alcone					
(-)-Spiculisporic acid	NA	$C_{17}H_{28}O_6$	neg	-	
2-Benzothiazolesulfonic acid	NA	$C_7H_5NO_3S_2$	neg		
3-Hydroxy-2-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxy}-3(methoxycarbonyl)pentane dioic acid	NA	$C_{16}H_{16}O_{10}$	neg	-	
4-Hydroxy-2-(2-hydroxyethyl)-1,2-dihydrophthalazin-1-one	NA	$C_{10}H_{10}N_2O_3$	neg	-	
2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1,5-benzothiazepine-4-thione	NA	$C_{18}H_{19}NO_3S$	neg	-	
4-Acetamidobutanoic acid	Amino acids, peptides, and analogues	$C_6H_{11}NO_3$	neg	antioxidant ⁽¹²⁰⁾	
Pantothenic acid	Alcohols	$C_9H_{17}NO_5$	pos/neg	moisture ⁽¹²¹⁾	
Methyl isonicotinate	NA	$C_7H_7NO_2$	pos	-	
Mesalamine	Benzene and derivatives	$C_7H_7NO_3$	pos	-	
Nicotinic acid	Pyridine and derivatives	$C_6H_5NO_2$	pos	antiaging, antioxidant ⁽⁸⁴⁾	
Pyridoxamine	Amines and derivatives	$C_8H_{12}N_2O_2$	pos	-	
6-Quinolinecarboxylic acid	NA	$C_{10}H_7NO_2$	pos	-	
2-(2-Hydroxypropyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione	NA	$C_{15}H_{13}NO_3$	pos	-	
Methylimidazoleacetic acid	Imidazoles	$C_6H_8N_2O_2$	pos	-	
4-(Diethylamino)salicylaldehy	NA	$C_{11}H_{15}NO_2$	pos	-	

de					
2-Amino-3-Methyl-1-Pyrrolidin-1-yl-Butan-1-One	NA	$C_{10}H_{18}O_2$	pos	-	
3-(propan-2-yl)-octahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	NA	$C_{10}H_{16}N_2O_2$	pos	-	
Cyclohexanecarboxylic acid	Organic acids	$C_7H_{12}O_2$	pos	-	
Dethiobiotin	Fatty acyls[FA]	$C_{10}H_{18}N_2O_3$	pos	-	
Dimethachlor OXA	NA	$C_{13}H_{17}NO_4$	pos	-	
Ethyl 2-(5-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)acetate	NA	$C_{14}H_{16}N_2O_3$	pos	-	
4-Acetamidobutanoic acid	Amino acids, peptides, and analogues	$C_6H_{11}NO_3$	pos	antioxidant, antibacterial ⁽¹²⁰⁾	
2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol	NA	$C_9H_{19}NO$	pos	-	
Dipropylene glycol dimethyl ether	NA	$C_8H_{18}O_3$	pos	-	
Cyclo(phenylalanyl-prolyl)	NA	$C_{14}H_{16}N_2O_2$	pos	-	

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอลิต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร
 NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก
 (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

สารเมแทบอลิต์ในส่วนของ BE

จากสารเมแทบอลิต์จำนวนมาก ได้คัดเลือกสารที่พบมากในสารสกัดและมีสรรพคุณทางเวชสำอาง ทั้งชนิดที่มีไอออนลบและไอออนบวก จำนวน 37 ชนิด แสดงในตาราง 24 ซึ่งพบว่าสารไอออนลบที่พบมาก ได้แก่ 4-Dodecylbenzenesulfonic acid (-), L-(+)-Lactic acid (-), Glyoxylic acid (-), Stearic acid (-), Dodecyl sulfate (-), Hypoxanthine (-), 3-Methylglutaric acid (-), Palmitic acid (-), 4-hydroxybenzoate (-), Succinic acid (-), D-gluconate (-), N1-(4-Morpholinophenyl)-2-

methylbut-2-enamide (-), 3[[hexylamino)carbonyl]amino}propanoic acid (-), N-(2-Morpholinoethyl)-4-(1H-pyrazol-1-yl)benzamide (-), Methylmalonic acid (-), Melibiose (-), Dimethachlor OXA (-), 6-Hydroxypicolinic acid (-), Pantothenic acid (+, -), Glycodeoxycholic acid (hydrate) (-) และ Lauric acid ส่วนสารไอออนบวกที่พบ ได้แก่ Choline (+), Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol (+), Metronidazole (+), DL-Carnitine (+), Nicotinamide (+), 1-[(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)sulfonyl]piperidine (+), Acenaphtho[1,2-b]quinoxaline (+), d-Valerolactam (+), Sphinganine (+), Biotin (+), Tyramine (+), Pilocarpine (+), 3-Hydroxyanthranilic acid (+), Nicotinate (+), Urocanic acid (+) และ Nicotinamide 1-oxide (+)

ตาราง 24 สารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BE จากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 และสรรพคุณทางเวชสำอาง

ชนิดสารเมแทบอลิต์*	กลุ่มของสารเมแทบอลิต์	สูตรโมเลกุล	ประจุ	สรรพคุณทางเวชสำอาง
4-Dodecylbenzenesulfonic acid	Benzene and substituted derivatives	$C_{18}H_{30}O_3S$	neg	surfactant ⁽⁷¹⁾
L-(+)-Lactic acid	Organic acids	$C_3H_6O_3$	neg	exfoliation, moisture, collagen stimulation ⁽⁷⁸⁾
Glyoxylic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_2H_2O_3$	neg	antiwrinkles, antiaging, moisture ⁽⁹¹⁾
Stearic acid	Fatty Acyls	$C_{18}H_{36}O_2$	neg	moisture ⁽⁸⁹⁾
Dodecyl sulfate	PK04 Macrolides and lactone polyketides	$C_{12}H_{26}O_4S$	neg	surfactant ⁽⁷⁴⁾
Hypoxanthine	Imidazopyrimidines	$C_5H_4N_4O$	neg	antioxidant ⁽⁹²⁾
3-Methylglutaric acid	Fatty Acyls	$C_6H_{10}O_4$	neg	antioxidant ⁽¹¹⁴⁾
Palmitic acid	Fatty Acyls	$C_{16}H_{32}O_2$	neg	antioxidant ⁽¹²²⁾
4-hydroxybenzoate	Benzene and	$C_7H_6O_3$	neg	antioxidant ⁽¹²³⁾

	substituted derivatives			
Succinic acid	Carboxylic acids	$C_4H_6O_4$	neg	-
	and derivatives			
D-gluconate	Organooxygen compounds	$C_6H_{12}O_7$	neg	-
N1-(4-morpholinophenyl)-2-methylbut-2-enamide	NA	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	neg	-
3[[[(hexylamino)carbonyl]amino]propanoic acid	NA	$C_{10}H_{20}N_2O_3$	neg	-
N-(2-Morpholinoethyl)-4-(1H-pyrazol-1-yl)benzamide	NA	$C_{16}H_{20}N_4O_2$	neg	-
Methylmalonic acid	Carboxylic acids and derivatives	$C_4H_6O_4$	neg	vitamin B12 ⁽¹²⁴⁾
Melibiose	Organooxygen compounds	$C_{12}H_{22}O_{11}$	neg	anti-inflammatory ⁽¹²⁵⁾
Dimethachlor OXA	NA	$C_{13}H_{17}NO_4$	neg	-
6-Hydroxypicolinic acid	NA	$C_6H_5NO_3$	neg	-
Pantothenic acid	Organooxygen compounds	$C_9H_{17}NO_5$	neg/ pos	moisture ⁽¹²¹⁾
Glycodeoxycholic Acid (hydrate)	NA	$C_{26}H_{43}NO_5$	neg	anti-inflammatory ⁽¹²⁶⁾
Lauric acid	Fatty Acyls	$C_{12}H_{24}O_2$	neg	-
Choline	Organonitrogen compounds	$C_5H_{13}NO$	pos	-
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	NA	$C_{24}H_{30}O_6$	pos	-
Metronidazole	Azoles	$C_6H_9N_3O_3$	pos	-
DL-Carnitine	NA	$C_7H_{15}NO_3$	pos	-
Nicotinamide	Pyridine and derivatives	$C_6H_6N_2O$	pos	boost hydration, Reduce wrinkles ⁽¹⁰⁹⁾
1-[(3,5-Dimethylisoxazol-	NA	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	pos	-

4-yl)sulfonyl]piperidine				
Acenaphtho[1,2-b]quinoxaline	NA	$C_{18}H_{10}N_2$	pos	-
d-Valerolactam	Piperidines	C_5H_9NO	pos	antibacterial ⁽¹¹⁷⁾
Sphinganine	Organonitrogen compounds	$C_{18}H_{39}NO_2$	pos	anti-inflammatory, antimicrobial ⁽¹⁰¹⁾
Biotin	Biotin and derivatives	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	pos	vitamin B7, antiaging ⁽¹²⁷⁾
Tyramine	Benzene and substituted derivatives	$C_8H_{11}NO$	pos	anti-inflammatory ⁽⁸⁵⁾
Pilocarpine	null	$C_{11}H_{16}N_2O_2$	pos	-
3-Hydroxyanthranilic acid	Benzene and substituted derivatives	$C_7H_7NO_3$	pos	antioxidant ⁽¹²⁸⁾
Nicotinate	Pyridines and derivatives	$C_6H_5NO_2$	pos	antiaging, antioxidant ⁽¹¹⁹⁾
Urocanic acid	Azoles	$C_6H_6N_2O_2$	pos	moisture ⁽¹²⁹⁾
Nicotinamide 1-oxide	Pyridines and derivatives	$C_6H_6N_2O_2$	pos	antiaging, antiacne ⁽¹³⁰⁾

หมายเหตุ: * ชนิดสารเมแทบอลิต์เรียงลำดับจากปริมาณที่พบมากไปน้อย โดยแยกตามไอออนสาร, NA คือ ไม่สามารถจัดกลุ่มของสารได้, “-” คือ ไม่พบสรรพคุณทางเวชสำอาง, pos คือ ไอออนบวก (positive charge), neg คือ ไอออนลบ (negative charge)

ตาราง 25 การเปรียบเทียบชนิดของสารเมแทบอไลต์ที่ได้จากสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ 3 สายพันธุ์
จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทานอลและเอทิลอะซิเตท

คุณสมบัติทาง เวชสำอาง	ชนิดของสาร	สารสกัดจากเห็ด					
		<i>C. dendriformis</i> PW17-134		<i>F. aspera</i> NP17-02		<i>G. lingzhi</i> PW17-43	
		BA	BE	BA	BE	BA	BE
Antiacne	Nicotinamide 1-oxide						
Antiaging	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid						
	Adenosine						
	Benzoic acid						
	Biotin						
	Glyoxylic acid						
	Nicotinic acid						
	Nicotinate						
	Nicotinamide 1-oxide (อนุพันธ์ วิตามิน B3)						
	Uridine						
Antioxidant	2-Hydroxycinnamic acid						
	3-Methylglutaric acid						
	3-Hydroxyanthranilic acid						
	3,4-dihydroxybenzoate						
	4-Acetamidobutanoic acid						
	4-Hydroxybenzoic acid						
	4-Hydroxybenzaldehyde						
	Acetophenone						
	Betaine						
	d-Gluconic acid d-lactone						
	Esculetin						
	Hypoxanthine						
	Imidazoleacetic acid						
	Itaconic acid						
	Methionine sulfoxide						
	N-Acetyl-L-aspartic acid						

Moisture	Allantoin					
	Betaine					
	Benzoic acid					
	Cyclo(tyrosyl-prolyl)					
	Ethyl myristate					
	Glyoxylic acid					
	Nicotinamide (วิตามิน B3)					
	DL-Lactic Acid					
	L-Valine					
	Pantothenic acid (วิตามิน B5)					
	Stearic acid					
	Urocanic acid					
Surfactant	4-Dodecylbenzenesulfonic acid					
	Dodecyl sulfate					
	Gluconic acid					
	Galacturonic acid					
	Ethyl myristate					
	Myristyl sulfate					
Vitamin B7						
	Biotin					
Vitamin B6						
	Pyridoxamine					
Vitamin B12						
	Methylmalonic acid					
Wound healing						
	Allantoin					

หมายเหตุ: ปริมาณของสารที่พบในปริมาณ เรียงลำดับตามความเข้มข้นของสีจากสีเขียวไปจนถึงสีเหลือง และ “สีเทา” คือ ไม่พบสาร

จากข้อมูลสารเมแทบอลิต์ของสารสกัดในส่วน BA ไม่น้อยกว่า 30 ชนิด ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจซึ่งเกี่ยวข้องกับเวชสำอาง เช่น 2-Hydroxycinnamic acid, 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid, Esculetin, Acetophenone และ Norharman เป็นต้น โดยสารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่หลากหลาย คือ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสช่วยให้ผิวกระจ่างใส รวมถึงสามารถยับยั้งการอักเสบได้อีกด้วย ซึ่งสารสำคัญส่วนใหญ่จะถูกลบในสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และ *C. dendriformis* PW17-134 ส่วนสารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 แม้ว่าพบสารสำคัญจำนวนที่น้อยกว่า แต่ก็พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เช่น 4-Acetamidobutanoic acid ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังพบสาร Pantothenic acid ที่ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้อีกด้วย นอกจากนี้ข้อมูลในตาราง 26 แสดงให้เห็นว่า 4-Dodecylbenzenesulfonic acid, Dodecyl sulfate, และ Nicotinic acid สามารถพบได้ในเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่จะพบใน *F. aspera* NP17-02 ในปริมาณที่มากที่สุด รองลงมาคือ *C. dendriformis* PW17-134 และ *G. lingzhi* PW17-43 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม Imidazoleacetic acid พบใน *G. lingzhi* PW17-43 และ *F. aspera* NP17-02 ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และพบน้อยที่สุดใน *C. dendriformis* PW17-134 แต่อย่างไรก็ตาม สารเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญสำหรับนำไปเป็นส่วนประกอบในเวชสำอาง

สำหรับสารเมแทบอลิต์ของสารสกัด BE ตามข้อมูลตาราง 25 พบว่ามีสารที่เกี่ยวข้องและมีฤทธิ์ที่ดีทางเวชสำอาง อย่างน้อย 32 ชนิด สำหรับสารเมแทบอลิต์ที่พบได้ในสารสกัดเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 4-Dodecylbenzenesulfonic acid ซึ่งพบมากในสารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 สำหรับสารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งนิยมใช้เป็นส่วนผสมในโฟมล้างหน้า หรือน้ำยาเช็ดเครื่องสำอางในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบ Dodecyl sulfate ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการอักเสบ โดยพบสารชนิดนี้ในสารสกัดเห็ดทั้ง 3 สายพันธุ์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ส่วนสาร Glyoxylic acid พบในสารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 ในปริมาณมากที่สุดรองลงมาคือ *F. aspera* NP17-02 และ *G. lingzhi* PW17-43 สำหรับเห็ดที่พบสารออกฤทธิ์มากที่สุดคือ *G. lingzhi* PW17-43 รองลงมาคือ *C. dendriformis* PW17-134 และ *F. aspera* NP17-02 ตามลำดับ ซึ่งสารที่พบเฉพาะใน *G. lingzhi* PW17-43 เช่น 3-Hydroxyanthranilic acid, Ethyl myristate, Glycodeoxycholic acid (hydrate), 3-Methylglutaric acid, Biotin, Melibiose, Nicotinamide, Nicotinamide 1-oxide, Palmitic acid, Pantothenic acid, Pyridostigmine, Sphinganine, Succinic acid และ Urocanic acid เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ตัวอย่างเห็ดบริสุทธิ์กลุ่มโพลีพอร์วังค์ Polyporaceae และ Ganodermaceae รวม 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Corioloopsis dendriformis* PW17-134, *Cubamycetes lactineus* PW17-03, *Funalia aspera* (Syn. *Corioloopsis aspera*) NP17-02, *Microporus vernicipes* PW17-173, *M. xanthopus* PP17-16, *Trametes hirsuta* PW17-41, *T. sanguinea* PP17-18, *Ganoderma fornicatum* PW17-199, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-111 และ *Ganoderma* sp. PP22-01 ซึ่งสายพันธุ์ PP22-01 ยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ เนื่องจากผลการเทียบเคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มีค่าร้อยละความเหมือนมากกว่าร้อยละ 97 กับเห็ด *Ganoderma* มากกว่า 1 สปีชีส์ ได้แก่ *G. acaciicola* และ *G. destructans* นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 มีความใกล้เคียงกับ *G. acaciicola* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานการค้นพบครั้งแรก ณ ประเทศออสเตรเลีย ในปี ค.ศ. 2018 คือมีลักษณะของดอกเห็ดสีน้ำตาลแดงเข้ม เบสิดิโอสปอร์รูปร่างกลมรีปลายมน (broadly ellipsoid to ovoid) มีผนังสองชั้น ผนังชั้นนอก (exospore wall) เรียบ ผนังชั้นใน (endospore wall) มีลักษณะเป็นหนาม (spinules) คล้ายกัน แต่เบสิดิโอสปอร์ของเห็ด *G. acaciicola* มีขนาดใหญ่กว่าเท่ากับ $(9-9.2-11.3(-11.6) \times (5-5.6-7.0)$ ไมโครเมตร⁽¹³¹⁾ ในขณะที่เบสิดิโอสปอร์ของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 มีขนาดเล็กกว่าเท่ากับ $5.9-9.2 \times 4.7-5.9$ ไมโครเมตร ส่วนเห็ด *G. destructans* ดอกเห็ดมีสีขาวครีม เบสิดิโอสปอร์มีรูปร่างกลมรีปลายมน ขนาดเท่ากับ $11.0-14.0 \times 7.0-9.0$ ไมโครเมตร⁽¹³²⁾ จากรายงานในปี 2022 ของ Jun และคณะ⁽¹³³⁾ พบว่า เห็ดสกุล *Ganoderma* มีประมาณ 190 สปีชีส์ ซึ่งบางสปีชีส์ยังไม่มีข้อมูลทางสัณฐานวิทยา รวมถึงข้อมูลทางลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่ชัด ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุชนิดของเห็ด *Ganoderma* sp. PP22-01 ได้ อย่างไรก็ตามหากต้องการระบุชนิดของเห็ดชนิดนี้ควรเก็บข้อมูลอย่างละเอียดของ เห็ดสกุล *Ganoderma* ทั้งหมด ทั้งในส่วนของสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเทียบเคียงกับข้อมูลของเห็ดสกุล *Ganoderma* ทั้งหมด จึงสามารถระบุสปีชีส์ได้อย่างถูกต้อง

จากผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM พบการเจริญของเส้นใยเห็ดที่ต่างกัน ทั้งสีและลักษณะของเส้นใย อัตราการเจริญ รวมทั้งสีของน้ำเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากความแตกต่างของ สปีชีส์และสายพันธุ์เห็ดแต่ละชนิด โดยงานวิจัยนี้ได้สกัดสารทั้งจากเส้นใย และน้ำเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากคาดว่าจะอาจได้สารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันเพื่อการใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย โดย

ใช้ตัวทำละลายสองชนิด ได้แก่ เอทานอล และเอทิลอะซิเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดราหลายชนิด⁽¹³⁴⁾ โดยเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเอทิลอะซิเตท เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดเป็นสารที่มีขั้วสูงถึงปานกลาง ผลการสกัดสารจากเห็ด 11 สายพันธุ์ จำนวนทั้งสิ้น 44 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารสกัดที่สกัดจากเส้นใยด้วยเอทานอล (ME) มีปริมาณสารสกัดต่อกรัมน้ำหนักแห้งสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากเส้นใยด้วยเอทิลอะซิเตท (MA) มีปริมาณสารสกัดน้อยที่สุด อาจเนื่องจากองค์ประกอบของเส้นใยเห็ดส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้วทำให้การสกัดด้วยเอทานอลได้ปริมาณสารมากกว่าเอทิลอะซิเตท ซึ่งเส้นใยเห็ดประกอบด้วยสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และเบต้ากลูแคน (beta-glucan) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้เป็นสารที่มีขั้วและมีฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย⁽¹³⁵⁾ ส่วนปริมาณสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อให้ผลเช่นเดียวกับสารสกัดจากเส้นใยคือ สารสกัดจากเอทานอล (BE) มีปริมาณที่มากกว่าเอทิลอะซิเตท (BA) แสดงให้เห็นว่าสารที่เห็ดผลิตแล้วปล่อยในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้ว อย่างไรก็ตามชนิดและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น ค่า pH อุณหภูมิ และการให้อากาศ ล้วนแต่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารเมแทบอไลต์ของเห็ด⁽¹³⁶⁾

สารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์จำนวน 11 สายพันธุ์ ในส่วนของ BA, BE และ ME จำนวน 33 ตัวอย่าง ได้นำมาทดสอบคุณสมบัติทางเวชสำอาง ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จากผลทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ จำนวน 3 วิธีเพื่อการยืนยันผล ได้แก่ 1) DPPH assay, 2) ABTS assay และ 3) FIC assay ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS อาศัยหลักการเดียวกันในการให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ (DPPH• และ ABTS•) วิธีทั้งสองนี้เป็นวิธีที่นิยมในการศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่างในการต้านอนุมูลอิสระอย่างแพร่หลาย จากผลการทดลองพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลไปในทางเดียวกันและสารสกัดจากเห็ดทุกตัวอย่างมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะ**สารสกัดในส่วน BA** มีคุณสมบัติที่สูงกว่าสารสกัดในส่วน BE และ ME โดยพิจารณาจากค่า IC_{50} ได้แก่ สารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02, *C. dendriformi* PW17-134 และ *G. lingzhi* PW17-43 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.074 ± 0.004 mg/mL, 0.026 ± 0.002 mg/mL และ 0.212 ± 0.078 mg/mL ตามลำดับ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH ทั้งนี้เห็ดสกุล *Coriolopsis* เป็นที่รู้จักดีว่ามีสรรพคุณทางยา โดยเฉพาะในประเทศอินเดีย จีน และญี่ปุ่น พบว่าสารสกัดจากเห็ดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง ไวรัส และแบคทีเรียได้ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมศึกษาสารสกัดจากดอกเห็ด เช่น งานวิจัยของ Nguyen และคณะ (2020) ได้สกัดสารจาก

ดอกเห็ด *C. aspera* ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท, เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, และน้ำ พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.072 mg/mL, 0.194 mg/mL, 0.570 mg/mL และ 0.720 mg/mL ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay⁽¹⁴⁾ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดในส่วนของ BA จากเห็ด *F. aspera* NP17-02 ที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้ออีกด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาของเห็ดชนิด *F. aspera* และ *C. retropicta* มาก่อน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการใช้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ทดแทนการสกัดจากดอกเห็ด ในขณะที่**สารสกัดในส่วน BE และ ME** มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใย โดยสารสกัดในส่วน BE ของ *G. lingzhi* PW17-43 มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.344 ± 0.023 mg/mL เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าสารสกัดจากเห็ดในสกุล *Ganoderma* หลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งบางชนิดสามารถรับประทานได้ เช่น *G. lucidum* หรือ *G. lingzhi* เป็นต้น เห็ดกลุ่มนี้มีสรรพคุณทางยาและมีจำนวนมากกว่า 80 สปีชีส์ ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชีย รวมถึงประเทศจีน นิยมนำเห็ด *G. lucidum* หรือเห็ดหลินจือ มาใช้ในการแพทย์แผนโบราณ รวมทั้งเป็นส่วนผสมในเวชสำอาง เนื่องจากเห็ดหลินจือมีส่วนประกอบสำคัญของสารโพลีแซ็กคาไรด์ เบต้ากลูแคน มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น เสริมระบบภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ลดความดันโลหิตสูง และต้านอนุมูลอิสระ⁽¹³⁷⁾ งานวิจัยในปี ค.ศ. 2021 ของ Fahmi และคณะ ที่ยืนยันว่าสารสกัดเอทานอลของดอกเห็ด *G. lucidum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.2519 mg/mL⁽¹³⁸⁾ ซึ่งเห็นว่าตัวทำละลายเอทานอลมีคุณสมบัติในการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดซึ่งสารที่ได้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้สารสกัดยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) โดยทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษ (O_2^-) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีพิษน้อยกว่า เป็นต้น⁽¹³⁹⁾ ส่วนการศึกษาสารสกัดจากเห็ด *C. aspera* ด้วยน้ำพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.720 mg/mL เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay⁽¹⁴⁾ ส่วนสารสกัดจากเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเห็ด *M. xanthopus* ก็พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 12.09 – 35.00 μ g/mL⁽¹⁴⁰⁾ และสารสกัดจากดอกเห็ด *M. vernicipes* ด้วยเอทานอลพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 552.70 ± 1.38 μ g/mL⁽¹⁴¹⁾

นอกจากนี้สารสกัดเส้นใยเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในส่วน ME พบว่าสารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41 มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.238 ± 0.001 mg/mL เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งเห็ดในสกุล *Trametes* เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ของจีน เนื่องจากเห็ดสกุลนี้บางชนิดถูกใช้เป็นยา และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้⁽¹⁴²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาส่วนใหญ่ที่เน้นศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเห็ด และเส้นใยบริสุทธิ์ของ *T. gibbosa* และ *T. versicolor* ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดจากดอกเห็ด และเส้นใยบริสุทธิ์ของ *T. gibbosa* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.67 ± 0.93 mg/mL และ 31.43 ± 0.83 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจาก *T. versicolor* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.46 ± 0.49 mg/mL และ 20.00 ± 1.57 mg/mL ตามลำดับ⁽²⁸⁾ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจากดอกเห็ด และเส้นใยมีค่าแตกต่างกัน อาจเนื่องจากมีสารเมแทบอลิต์ที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ อย่างไรก็ตามเส้นใยเห็ดจากการเพาะเลี้ยงและน้ำเลี้ยงเชื้อมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ทั้งนี้ในการศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดยังได้ศึกษาด้วยวิธี FIC assay ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการจับไอออนโลหะของสารสกัด ซึ่งสารสกัดในส่วน BA, BE และ ME ให้ผลไปในทางเดียวกันกับวิธี DPPH assay และ ABTS assay แต่เมื่อพิจารณาถึงค่า IC_{50} พบว่ามีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับ 2 วิธี ก่อนหน้า เนื่องจาก FIC assay เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการจับกับไอออนโลหะ Fe^{2+} (ferrous ion) เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากงานวิจัยของ Azieana และคณะ ที่ใช้วิธีในการวัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดสกัดด้วยเมทานอลและคลอโรฟอร์มจำนวน 10 สปีชีส์ ด้วยวิธี DPPH assay และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งเป็นการวัดคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ไอออนโลหะ Fe^{3+} (ferric ion) เป็น Fe^{2+} พบว่ามีค่า IC_{50} จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีต่างกัน อาจเนื่องจากเป็นการวัดคุณสมบัติที่ใช้หลักการแตกต่างกัน⁽¹⁴³⁾ นอกจากนี้การศึกษาด้านอนุมูลอิสระของดอกเห็ด *G. lucidum* ด้วยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.3 ± 1.04 μ mol TE/g ซึ่งต่างจากวิธี FRAP ที่มีค่า IC_{50} สูงกว่าเท่ากับ 49.87 ± 1.58 μ mol TE/g⁽¹⁴⁴⁾ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการวัดคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระควรใช้วิธีวิเคราะห์มากกว่า 1 วิธี เพื่อการยืนยันคุณสมบัติและการศึกษาที่ครอบคลุมอีกด้วย

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดเป็นอีกวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งสารที่ใช้ในเวชสำอาง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ และ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น ดังนั้นจึงนิยมศึกษาควบคู่ไปกับการฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น ๆ จากผลการทดลองในการศึกษาค้นคว้าพบว่าสารสกัดในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งในส่วนสารสกัด BA และ BE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากกว่าสารสกัดในส่วนเส้นใย ME อาจเนื่องจากสารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิที่เห็ดราผลิตออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ ส่วนตัวทำละลายที่สกัดสารประกอบฟีนอลได้มากคือเอทิลอะซิเตท ในขณะที่ตัวทำละลายเอทานอลสกัดได้ปริมาณที่น้อยกว่า เพราะสารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่ละลายได้ดีในเอทิลอะซิเตท นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดได้แก่ สารสกัดในส่วน BA ของ *M. vernicipes* PW17-173 ซึ่งมีค่าเท่ากับ $71.623 \pm 1.677 \mu\text{g GAE/mg extract}$ รองลงมาคือสารสกัดในส่วน BA ของ *C. dendriformis* PW17-134 ($68.415 \pm 0.865 \mu\text{g GAE/mg extract}$) ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ตัวอย่าง มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง อาจเนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเป็นสารประกอบฟีนอล อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเห็ดบางชนิดพบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำแต่พบสารประกอบฟีนอลที่สูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารประกอบฟีนอลที่พบอาจไม่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจมีคุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่น ๆ เป็นต้น จากงานวิจัยของ Cheung และคณะ ในการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดหอม (*L. edodes*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ด้วยเมทานอลและน้ำ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันคือสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงไปด้วย⁽¹⁴⁵⁾ และงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากพืช 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Curcuma mangga*, *Zingiber officinale* และ *Zingiber montanum* พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงและมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบอีกด้วย ซึ่งมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน⁽¹⁴⁶⁾

ในการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดในการต้านการอักเสบมีหลายวิธี ซึ่งวิธีที่เลือกศึกษา คือ NO radical scavenging activity เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นหนึ่งในสารสื่อกลางที่ชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ มีบทบาทในการควบคุมการทำงาน การเจริญ และการตายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งเซลล์ macrophage, T lymphocytes, antigen-presenting cells, mast

cells, neutrophils และ natural killer cells เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งการเกิด ไนตริกออกไซด์จึงสามารถบ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ ผลการศึกษาค้นคว้าพบว่าสารสกัดของเห็ดทุกสายพันธุ์มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเล็กน้อยแตกต่างกัน ทั้งจากน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยบริสุทธิ์ โดยเฉพาะสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 และ *C. dendriformis* PW17-134 ซึ่งไม่ต่างจากวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทของ *C. aspera* มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบเมื่อทดสอบด้วยวิธี NO radical scavenging activity โดยพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ และ 100 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นได้เท่ากับ $9.76 \pm 0.21\%$ และ $14.39 \pm 0.44\%$ ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของเห็ดโพลีพอร์รัสในสกุล *Ganoderma* มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ จากการศึกษาสารไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) จากเห็ดหลินจือ *G. lucidum* ซึ่งนอกจากจะยับยั้งการเกิด NO แล้วยังสามารถยับยั้งการสร้างสารไซโตไคน์ (cytokines) ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น IL-6, IL-23 และ p-19 ได้อีกด้วย⁽¹⁴⁷⁾ อย่างไรก็ตามเห็ดหลายชนิดจากการศึกษาค้นคว้านี้ยังไม่มีรายงานถึงสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อว่ามีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบได้มาก่อน ส่วนงานวิจัยของ Bains และ Chawla ที่ศึกษาสารสกัดจากเส้นใยเห็ด *T. versicolor* ด้วยเมทานอลพบว่ามีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบที่ดี และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สูง (48.71 mg/g) นอกจากนี้ยังพบฟลาโวนอยด์ วิตามินซี เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) และ ไลโคปีน (lycopene)⁽¹⁸⁾ สำหรับเห็ดสกุล *Microporus* ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านการต้านการอักเสบ มีเพียงการศึกษาของ Herawati และคณะ ที่ศึกษาสารสกัดจาก *M. xanthopus* พบมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิด ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ ที่อาจเกี่ยวข้องกับความสมดุลด้านการอักเสบ⁽¹⁴⁸⁾ จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบส่วนใหญ่ที่ผ่านมาผู้วิจัยนิยมศึกษาสารสกัดจากดอกเห็ด มีเพียงส่วนน้อยที่ศึกษาสารสกัดจากการเพาะเลี้ยงทั้งส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยบริสุทธิ์

การศึกษาค้นสมบัติของสารสกัดที่เกี่ยวข้องกับเวชสำอางที่นิยมอีกคุณสมบัติคือการลดเม็ดสีเมลานิน ซึ่งในการศึกษาค้นคว้านี้ได้ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ผลการทดสอบของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดในส่วนของ BA, BE และ ME มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทุกสาร โดยเฉพาะสารจากเห็ด *C. dendriformis* PW-134, *F. aspera* NP17-

02, *G. lingzhi* PW17-43, *G. mastoporum* PW17-111, *T. hirsuta* PW17-41 และ *M. xanthopus* PP17-16 เป็นต้น โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือ *G. lucidum* ชนิด ganodermanondiol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส-1 และไทโรซิเนส-2 ได้ ส่งผลให้การผลิตเม็ดสีเมลานินลดลง นอกจากนี้ *G. formosanum* ที่สกัดจากส่วนของเส้นใยบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/mL สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เท่ากับ $53.4 \pm 3.82\%$ ⁽¹⁴⁹⁾ ในประเทศไทยมีรายงานฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rugiboletus extremiorientalis*, *Russula emetica*, *Russula* sp. และ *Phlebopus portentosus* เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด (เอทานอล 95%, เมทานอล 95%, น้ำ และ กรดไฮโดรคลอริก 1%) พบว่ามีเพียงสารสกัดจาก 95% เมทานอล ของเห็ด *R. extremiorientalis*, *R. emetica* และ *P. portentosus* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ เมื่อรายงานเทียบกับปริมาณของกรดโคจิก (kojic acid) ในหน่วย mg KAE/g น้ำหนักแห้ง (dry weight, DW) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.17 mg KAE/g DW, 0.066 mg KAE/g DW และ 0.056 mg KAE/g DW ตามลำดับ ⁽¹⁵⁰⁾ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดเห็ดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ผิวหนังเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาใช้เพื่อเป็นส่วนผสมในเวชสำอาง นอกจากจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีแล้วควรมีความปลอดภัยด้วย เนื่องจากเซลล์ผิวหนังของมนุษย์มีหลายชนิด ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์ผิวหนังเคราติโนไซต์ของมนุษย์ ชนิด HaCaT เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์หลักที่พบในชั้นหนังกำพร้า ประมาณร้อยละ 90 มีบทบาทสำคัญในการป้องกันร่างกาย มีโครงสร้างที่แข็งแรง และมีจำนวนมาก ช่วยป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย รักษาความชื้น ความร้อน และองค์ประกอบต่างๆ ให้สูญเสียอย่างน้อยที่สุด จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพได้คัดเลือกสารสกัดเห็ดจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02, *G. lingzhi* PW17-43, *T. hirsuta* PW17-41, *Microporus vernicipes* PW17-173, และ *M. xanthopus* PP17-16 จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด จากน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE และ BA) และจากเส้นใย (ME) รวมทั้งสิ้น 18 ตัวอย่าง ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเห็ดส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 62.5-125 $\mu\text{g/mL}$ พบการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ

และจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเห็ดโพลีพอร์ที่คัดเลือกมา เมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น เห็ด *F. aspera* NP17-02 ที่สกัดจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 74 µg/mL มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% โดยที่ความเข้มข้นนี้มีการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับร้อยละ 100 ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดชนิดนี้ในทางการแพทย์โดยเฉพาะการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง แต่มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังทางด้านเวชสำอางอย่างจำกัด ตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดสกุล *Coriolopsis* ซึ่งนิยมใช้เป็นยา พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ได้ดี⁽¹⁴⁾ ส่วนสารสกัดจากเห็ดหลินจือ *G. lucidum* พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด รวมทั้งมะเร็งผิวหนัง⁽¹⁵¹⁾ ในขณะที่งานวิจัยของ Taofiq และคณะ (2019) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากดอกเห็ด *G. lucidum* และ *Pleurotus ostreatus* เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของเวชสำอางได้ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์เคราติโนไซต์ HaCaT และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) HFF-1 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 µg/mL มีการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT สูงถึงร้อยละ 90 ส่วนเซลล์ HFF-1 มีการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 60 เท่านั้น⁽¹⁵²⁾ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอล และเอทิลอะซิเตทของ *G. lingzhi* PW17-43 กับเซลล์เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ความเข้มข้นในช่วง 3.9 – 500 µg/mL พบว่า สารสกัดเอทานอลจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 125 µg/mL เริ่มส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์โดยเทียบกับชุดควบคุม โดยมีร้อยละการรอดชีวิต 76.66 ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าสารสกัดนี้มีสารประเภทลดแรงตึงผิว เช่น 4-Dodecylbenzenesulfonic acid และ Dodecyl sulfate ซึ่งมีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวส่งผลต่อเซลล์ผิวหนัง เมื่อ สารลดแรงตึงผิวแทรกซึมผ่านชั้นผิวหนังจะส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์และส่วนประกอบโครงสร้างของเคราติโนไซต์ได้รับความเสียหาย ส่งผลให้สารตัวกลางที่ก่อให้เกิดการอักเสบถูกปล่อยออกมา⁽¹⁵³⁾ ต่อมาในงานวิจัยของ Ziemlewska และคณะ (2022) พบว่าสารสกัดจากน้ำของเห็ดไมตาเกะ *Grifola frondosa* และเห็ดหัวลิง *Hericium erinaceus* ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ชนิด BJ และเซลล์ HaCaT ซึ่งสารสกัดดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการต้าน อนุมูลอิสระที่โดยรวมทั้งลดการระคายเคืองของผิวได้ เนื่องจากพบส่วนประกอบของฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอล จึงนำมาพัฒนาเติมส่วนผสมของเห็ดสกัดในเจลล้างหน้า ซึ่งพบว่าช่วยรักษาความชุ่มชื้นและลดการสูญเสียน้ำจากผิวหนังอีก

ด้วย⁽¹⁵⁴⁾ ในขณะที่สารสกัดจากเห็ดสกุล *Trametes* (*T. gibbosa*, *T. hirsuta* และ *T. versicolor*) ทั้งจากดอกเห็ดและเส้นใยบริสุทธิ์มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (LS174) และมะเร็งปอด (A549⁽²⁸⁾) แต่ยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดสกุลนี้ทางเวชสำอางมาก่อน อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้สารสกัดจาก *T. hirsuta* PW17-41 ที่สกัดด้วยเอทานอลทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่ามีความเป็นพิษต่ำมีการรอดชีวิตของเซลล์ HaCaT ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 125 µg/mL ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นเดียวกันมีผลต่อการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 90 เช่นเดียวกับสารสกัดจาก *Microporus* ที่มีรายงานว่าฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ขาดข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัด *M. vernicipes* PW17-173 และ *M. xanthopus* PP17-16 ทั้งจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ต่ำเช่นเดียว *Trametes* ดังนั้นสารสกัดจากเห็ดทั้ง 18 ตัวอย่างจากเห็ด 6 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงน่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อไป

จากข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ด และความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ของสารทั้ง 18 ตัวอย่าง ประกอบกับปริมาณของสารสกัดที่สกัดได้ ได้คัดเลือกสารจำนวน 6 ตัวอย่าง จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (BA) และเอทานอล (BE) ของเห็ดจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 และ *G. lingzhi* PW17-43 มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดแบบไม่จำเพาะ (untargeted metabolomes) ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบสารเมแทบอไลต์มากถึง 3,357, 3,237 และ 2,909 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนนี้พบสารที่มีฤทธิ์ทางเวชสำอางที่น่าสนใจหลายชนิด เมื่อใช้สารสกัดที่ต่างชนิดกันก็พบว่าได้ชนิดสารออกฤทธิ์ต่างกัน (i) สารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 พบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบหลายชนิด สารลดเลือนริ้วรอย (Glyoxylic acid และ Nicotinic acid หรือวิตามิน บี 3 สารมอยเจอร์ไรเซอร์ (Benzoic acid และ Cyclo(tyrosyl-propyl)) สารเพิ่มความกระจ่างใส (DL-Lactic Acid) และ วิตามิน บี 6 นอกจากนี้ยังพบสารที่ต่างจากเห็ดอีก 2 สายพันธุ์ ที่ศึกษาหลายชนิด รวมทั้ง 2-Hydroxycinnamic acid สารอนุพันธ์ของ Hydroxycinnamic acids ซึ่งเป็นสารสำคัญในเวชสำอาง เนื่องจากมีสรรพคุณที่หลากหลายทั้งการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase) ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และป้องกันรังสียูวี (ultraviolet protection) ได้อีกด้วย จึงได้รับ

ความสนใจอย่างยิ่งในการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอาง⁽¹⁵⁴⁾ ทั้งนี้เห็ด *C. dendriformis* เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานครั้งแรกในประเทศจีน และถูกให้ชื่อในปี ค.ศ. 2019 โดย Cui และคณะ⁽¹⁵⁵⁾ ส่วนในประเทศไทยมีรายงานความหลากหลายของเห็ดสปีชีส์นี้จำกัด ที่สำคัญยังไม่มีข้อมูลชนิดสาร เมแทบอไลต์ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อนซึ่งเห็ดในสกุล *Coriopsis* ที่มีรายงานสารออกฤทธิ์ เช่น ราเอนโดไฟท์ *Coriopsis rigida* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มพบสารประกอบฟีนอลชนิด tyrosol และ *p*-hydroxyphenylacetamide ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี⁽¹⁵⁵⁾ และงานวิจัยของ Thuan และคณะ (2023) ศึกษาสารสกัดจากดอกเห็ด *Coriopsis aspera* ในประเทศเวียดนาม ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล น้ำ และเอทานอล พบสารที่สำคัญ เช่น โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นต้น⁽¹⁴⁾ ซึ่งในงานวิจัยนี้ศึกษา (ii) สารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 (syn. *C. aspera*) พบสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่เหมือนและต่างจาก *C. dendriformis* PW17-134 ในการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบหลายชนิด สารต้านริ้วรอย (3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid, Adenosine, Glyoxylic acid, Uridine และ วิตามิน บี 3) มอยเจอร์ไรเซอร์ (Betaine, Nicotinamide และ L-Valine) สารเพิ่มความกระจ่างใส (DL-Lactic Acid) สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (3,4-Dihydroxybenzoate) และวิตามิน บี 6 สารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 ที่สกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลอะซิเตท เป็นตัวอย่างเดียวที่พบสาร 3,4-Dihydroxybenzoate และ Vanillin ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้⁽¹⁵⁶⁾ นอกจากนี้ยังพบสาร Adenosine ซึ่งมีสรรพคุณในการต้านการอักเสบและลดเลือนริ้วรอย ใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางหลายชนิด (iii) สารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 หรือเห็ดหลินจือ สายพันธุ์ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้พบสารที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ทางเวชสำอางก่อนหน้านี้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบซึ่งจำนวนชนิดสารน้อยกว่าเห็ดที่ศึกษาก่อนหน้า สารต้านริ้วรอย (Glyoxylic acid และ วิตามิน บี 3) มอยเจอร์ไรเซอร์ (วิตามิน บี 5, Stearic acid และ Urocanic acid) สารเพิ่มความกระจ่างใส (DL-Lactic Acid) สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (3,4-Dihydroxybenzoate) ซึ่งพบสารที่น่าสนใจต่างจากเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ก่อนหน้านี้ เช่น วิตามิน บี 5, 7 และ 12 รวมทั้งสาร Nicotinamide 1-oxide (อนุพันธ์ของวิตามิน บี 3) ล้วนแต่มีสรรพคุณทางเวชสำอางทั้งสิ้น ทำให้สารสกัดเห็ดหลินจือเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการเป็นส่วนผสมของเวชสำอางหลายชนิด อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ ได้ข้อมูลของสารสกัดหลายชนิดจากเห็ดทั้ง 3

สายพันธุ์ ซึ่งมี 2 สายพันธุ์ ของ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากจะเป็นข้อมูลใหม่แล้วยังยืนยันได้ว่าสารสกัดจากเห็ดสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดโดยใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอางได้ในอนาคต

ผลที่ได้รับจากงานวิจัย

ข้อมูลสารสกัดจากเห็ดกลุ่มโพลีพอร์จำนวน 11 สายพันธุ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท จากส่วนของเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระด้านการอักเสบ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

แหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติทางด้านเวชสำอางที่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้

ข้อมูลความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดรากกลุ่มโพลีพอร์ ต่อเซลล์ผิวหนังเคราตินไนไซต์ เพื่อประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบทางด้านเวชสำอาง

ทราบชนิดของสารเมแทบอไลต์ทั้งหมดของ *C. dendriformis* PW17-134, *F. aspera* NP17-02 และ *G. lingzhi* PW17-43 ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

บรรณานุกรม

1. วราภรณ์ เทียนเงิน. ธุรกิจ [Internet]. กรุงเทพฯ: กรุงเทพฯธุรกิจ. c2023. [cited 7 มกราคม 2567]. Available from: <https://www.bangkokbiznews.com/business/business/1089181>.
2. Mortimer PE, Karunarathna SC, Li Q, Gui H, Yang X, Yang X, et al. Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. *Fungal Diversity*. 2012;56(1):31-47.
3. Donghyun K, Jiyeoun P, Jinhee K, Cheolkyu H, Jeonghyeok Y, Namdoo K, et al. Flavonoids as mushroom tyrosinase Inhibitors: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem*. 2006;54(3):935-41.
4. Wu Y, Choi MH, Li J, Yang H, Shin HJ. Mushroom cosmetics: the present and future. *Cosmetics*. 2016;3(3):22.
5. Camassola M. Mushrooms-the incredible factory for enzymes and metabolites productions. *Ferment Technol*. 2013;2(1):1000e117.
6. Justo A, Miettinen O, Floudas D, Santana BO, Sjakvist E, Lindner D, et al. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). *Fungal Biol*. 2017;121(9):798-824.
7. Meng L, Zhou R, Lin J, Wang Q, Wang P, Wang W, et al. Integrated transcriptomics and nontargeted metabolomics analysis reveal key metabolic pathways in *Ganoderma lucidum* in response to ethylene. *J Fungi*. 2022;8(5).
8. Choeyklin H, Jones EBG. A checklist of aphyllophoraceous fungi in Thailand: Part I. new records. *Mycosphere*. 2011;2(2):161.
9. Thamvithayakorn P, Phosri C, Pisutpaisal N, Krajangsang S, Whalley AJS, Suwannasai N. Utilization of oil palm decanter cake for valuable laccase and manganese peroxidase enzyme production from a novel white-rot fungus, *Pseudolagarobasidium* sp. PP17-33. *3 Biotech*. 2019;9(11):417.
10. Hapuarachchi KK. Ganodermataceae (Polyporales): Diversity in greater Mekong subregion countries (China, Laos, Myanmar, Thailand and Vietnam). *Mycosphere*. 2019;10(1):221-309.

11. Sotome K, Matozaki T, Aimi T, Boonlue S. *Polyporus thailandensis*, a new species of group Polyporellus in Polyporus (Polyporales, Agaricomycota) from Northeastern Thailand. *Mycoscience*. 2016;57(2):85-9.
12. Seweryn E, Ziala A, Gamian A. Health-promoting of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*. *Nutrients*. 2021;13(8):2725.
13. Ziaja KS, Balik M, Szczepkowski A, Trepka M, Zengin G, Kala K, et al. A review of chemical composition and bioactivity studies of the most promising species of *Ganoderma* spp. *Diversity*. 2023;15(8):882.
14. Thuan NN, Mai DS, Thien L, T. , Ngan NT, Thien VH, Quoc PT, et al. Chemical composition and antioxidant anti-inflammatory, and anticancer effects of extracts from, Yunzhi mushroom (*Coriolopsis aspera*) in Vietnam. *Pharmacophore* 2020;11(4):51-5.
15. Cosmetics Market Canada: Precedence Research; c2023 [Available from: <https://www.precedenceresearch.com/cosmetics-market#:~:text=The%20global%20cosmetics%20market%20size,5.8%25%20from%202023%20to%202032>].
16. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms*. 2010;12(1):1-16.
17. Chien R, Chieh YS, Min LL, Leun MJ. Anti-Inflammatory and antioxidant properties of pulsed light Irradiated *Lentinula edodes*: anti-inflammation and antioxidant of shitake. *J Food Process Preserv*. 2016;41(4):e13045.
18. Bains A, Chawla P. In vitro bioactivity, antimicrobial and anti-inflammatory efficacy of modified solvent evaporation assisted *Trametes versicolor* extract. *3 Biotech*. 2020;10(9):404.
19. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118-26.
20. Kammeyer A, Luiten R. Oxidation events and skin aging. *ARR*. 2015;21:16-29.
21. Kotha RR, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative stress and antioxidants -a critical review on In vitro antioxidant assays. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(12):2388.
22. Lourenco SC, Moldao MM, Alves VD. Antioxidants of natural plant origins: from

sources to food Industry applications. *Molecules*. 2019;24(22):4132.

23. Barbosa JR, Freitas MMS, Oliveira LC, Martins LHS, Vilhena AOA, Oliveira RM, et al. Obtaining extracts rich in antioxidant polysaccharides from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* using binary system with hot water and supercritical CO₂. *Food Chem*. 2020;330:127173.

24. Luo L, Wang Y, Zhang S, Guo L, Jia G, Lin W, et al. Preparation and characterization of selenium-rich polysaccharide from *Phellinus igniarius* and its effects on wound healing. *Carbohydr Polym*. 2021;264:117982.

25. Lang Y, Gao N, Zang Z, Meng X, Lin Y, Yang S, et al. Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *JFF*. 2024;4(3):193-204.

26. Berker KI, Guciu K, Demirata B, Apak R. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Anal Methods*. 2010;2(11):1770-8.

27. Ostek JK, Oszmianski J, Szyjka A, Moreira H, Barg E. Anticancer and antioxidant activities in *Ganoderma lucidum* wild mushrooms in Poland, as well as their phenolic and triterpenoid compounds. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16):9359.

28. Knezevic A, Stajic M, Sofrenic I, Stanojkovic T, Milovanovic I, Tesevic V, et al. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected *Trametes* species from Serbia. *PLoS One*. 2018;13(8):e0203064.

29. Inci S, Akyuz M, Kirbag S. Antioxidant and antimicrobial effects of *Trametes versicolor* (L.) Lloyd extracts in different solvents. *Turk j sci technol*. 2022;17(2):261-5.

30. Rodriguez G, Carlos H, Medrano A, Zavala J, Chen C, Sanchez R, et al. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct*. 2014;5(2):189-97.

31. Randhir R, Tong L, Shetty K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem*. 2004;39(5):637-46.

32. Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, et al. An overview of plant phenolic compounds and their Importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*. 2016;21(10):1374.

33. Kruk J, Enein B, Duchnik E, Marchlewicz M. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *J Physiol Sci.* 2022;72(1):19.
34. Orazio J, Jarrett S, Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013;14:12222-48.
35. Hamouda S, Yasin K, Abdalla., Maqboula K, Ibrahim NK. Ultraviolet radiation: health risks and benefits. *Saudi J Eng Technol.* 2022;7(10):533-41.
36. Walocko F, Eber A, Keri J, Harbi M. The role of nicotinamide in acne treatment. *Dermatol Ther.* 2017;30(5):10.1111/dth.12481.
37. Thody A, Higgins E, Wakamatsu K, Ito S, Burchill S, Marks J. Pheomelanin as well as Eumelanin is present in human epidermis. *JID.* 1991;97(2):340-4.
38. Chen X, Xiao D, Du X, Guo X, Zhang F, Desneux N, et al. The role of the dopamine melanin pathway in the ontogeny of elytral melanization in *Harmonia axyridis*. *Front Physiol.* 2019;10:1066.
39. Razak D, Jamaluddin A, Rashid N, Sani N. Assessment of cosmeceutical potentials of selected mushroom fruitbody extracts through evaluation of antioxidant, anti-hyaluronidase and anti-tyrosinase activity. *J Multidiscip Res.* 2020;3(3):329-42.
40. Jang Y, Di HK, Jung HT, Wei HC, Hin CY, Chen CK. Anti-melanogenic effect from submerged mycelial cultures of *Ganoderma weberianum*. *Mycobiology.* 2019;47(1):112-9.
41. Ziaja K, Grabowska K, Apola A, Poprawa A, Ska B. Mycelial culture extracts of selected wood-decay mushrooms as a source of skin-protecting factors. *Biotechnol Lett.* 2021;43(5):1051–61.
42. Sierra A, Navascues J, Miguel A, Cuadros, Calvente R, Oliva D, et al. Expression of Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in microglia of the developing quail retina. *PLoS One.* 2014;9(8):e106048.
43. Sharma J, Omran A, Parvathy S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007;15(6):252-9.
44. Bains A, Tripathi A. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory properties of aqueous extract of wild mushrooms collected from Himachal Pradesh. *Asian J Pharm Clin*

Res. 2017;10(3):467-72.

45. Aursuwanna T, Noitang S, Sangtanoo P, Srimongkol P, Saisavoey T, Puthong S, et al. Investigating the cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of the novel peptides in Lingzhi mushrooms. *Heliyon*. 2022;8(10):e11067.
46. Erbiai E, da Silva L, Saidi R, Lamrani Z, Esteves D, Silva J, et al. Chemical composition, bioactive compounds, and antioxidant activity of two wild edible mushrooms *Armillaria mellea* and *Macrolepiota procera* from two countries (Morocco and Portugal). *Biomolecules*. 2021;11(4):575.
47. Vinotha V, Rajakumar R. Determination of phytochemicals from methanol extracts of *Ganoderma lucidum* by LC-MS. *IJRAR*. 2019;6(1):914-8.
48. Raseta M, Popovic M, Capo I, Stilinovic N, Vukmirovic S, Milosevic B. Antidiabetic effect of two different *Ganoderma* species tested in alloxan diabetic rats. *RSC Adv*. 2020;10(17):10382-93.
49. Zelzer S, Meinitzer A, Enko D, Herrmann M, Goessler W. Development of a two-dimensional liquid chromatography-tandem mass-spectrometry method for the determination of vitamin D2 in mushrooms. *Anal Bioanal Chem*. 2022;414(26):7565-72.
50. Raluca M, Cosmin I, Chedea A, Veronica S, Bocsan N, Ioana C. Characterization of *Trametes versicolor*: medicinal mushroom with important health benefits. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Na*. 2018;46(2):343-9.
51. Lulevich V, Ya YS, Rivkah R, Isseroff., Yu LG. Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy*. 2010;110(12):1435-42.
52. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food front*. 2020;1(3):332-49.
53. Zhang Y, Zhong J, Huang Y, Jian J, Cai S. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides as immunostimulants against *Vibrio harveyi* in pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*). *Front Mar Sci*. 2022;9:968838.
54. Cheng W, Di F, Li L, Pu C, Wang C, Zhang J. Anti-photodamage effect of *Agaricus blazei* Murill polysaccharide on UVB-damaged HaCaT cells. *Int J Mol Sci*.

2024;25(9):4676.

55. Jhan M, Yen C, Tsai C, Kao C, Chang C, Hsieh C. Enhancing the antioxidant ability of *Trametes versicolor* polysaccharopeptides by an enzymatic hydrolysis process. *Molecules*. 2016;21(9):1215.

56. Zairun M, Suriza M, Seman I, Bakar M, Kamaruddin S, Bharudin I, et al. Comparison of DNA extraction and detection of *Ganoderma*, causal of basal stem rot disease in oil palm using loop-mediated isothermal amplification. *MAB*. 2018;4(5):119-27.

57. Mardones VM, Hidalgo JM, Fernandez MA, Urbina X. Taxonomy and phylogeny of the genus *Ganoderma* (Polyporales, Basidiomycota) in Costa Rica. *MycKeys*. 2023;100:5-47.

58. Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R. Antioxidants: classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials (Basel)*. 2021;14(15):4135.

59. Ielciu I, Frederich M, Hanganu D, Angenot L, Olah N, Ledoux A, et al. Flavonoid analysis and antioxidant activities of the *Bryonia alba* L. aerial parts. *Antioxid Act*. 2019;8(4):108.

60. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):1131.

61. Dzoyem J, McGaw L, Eloff J. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:147.

62. Gulcin I, Alwasel SH. Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*. 2022;10(1):132.

63. Adjimani JP, Asare P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol Rep*. 2015;2:721-8.

64. Kolundzic M, Grozdanic ND, Dodevska M, Milenkovic M, Sisto F, Miani A, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae. *Ind Crop Prod*. 2016;79:110-5.

65. Inkanuwat A, Sukaboon R, Reamtong O, Asawanonda P, Pattaratanakun A, Saisavoey T, et al. Nitric oxide synthesis inhibition and anti-Inflammatory effect of polypeptide isolated from chicken feather meal in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *FTB*. 2019;57(2):200-12.
66. Ma X, Shao S, Xiao F, Zhang H, Zhang R, Wang M, et al. *Platycodon grandiflorum* extract: chemical composition and whitening, antioxidant, and anti-inflammatory effects. *RSC Adv*. 2021;11(18):10814-26.
67. Bae IA, Ha JW, Choi JY, Boo YC. Antioxidant effects of Korean propolis in HaCaT keratinocytes exposed to particulate matter 10. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4):781.
68. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and Interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
69. Chen K, Chen Y, Cheng C, Jhan K, Chiu C, Wang L. 3-Hydroxybenzaldehyde and 4-Hydroxybenzaldehyde enhance survival of mouse astrocytes treated with *angiostrongylus cantonensis* young adults excretory/secretory products. *Biomed J*. 2021;44(6 Suppl 2):S258-S66.
70. Sekino Y, Yamamoto I, Watanabe M, Kuramochi K, Furuyama Y. Cyclo(I-Pro-I-Tyr) isolated from the human skin commensal *Corynebacterium tuberculostearicum* Inhibits tyrosinase. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13):7635.
71. Shiri M, Zolfigol M. Surfactant-type catalysts in organic reactions. *Tetrahedron*. 2009;65(3):587-98.
72. Becker L, Bergfeld W, Belsit D, Hill R, Klaassen C, Liebler D, et al. Safety assessment of alkyl benzoates as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2012;31(6 Suppl):342S - 72S.
73. Tofalo R, Perpetuini G, Schirone M, Suzzi G. Biogenic amines: toxicology and health effect. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016;1:424-9.
74. Niraula T, Bhattarai A, Chatterje S. Sodium dodecylsulphate: a very useful surfactant for scientific investigation. *JKIC*. 2014;2(1):111-3.
75. Khatun R, Singh S, Dubey N, Das A. Chapter 22 - a review on marine-based phytochemicals and their application in biomedical research. *Phytochem Lett*.

2023;22:383-95.

76. Yap Y, Omasanggar R, Koh Y, Yew M, Lai H, Chye S, et al. Neurotoxic effect of salsolinol through oxidative stress induction and Nrf2-Keap1 signalling regulation. JOCPR. 2016;8(5):30-8.

77. Dalbeth N, Stamp L. Chapter 13 - xanthine oxidase inhibitor treatment of hyperuricemia. G&OCA. 2012;13:154-73.

78. Lee K, Chan L, Lee A, Lee C, Wong S, Yi K. Poly-d,l-lactic acid (PDLLA) application in dermatology: a literature review. Polymers (Basel). 2024;16(18):2583.

79. Pharmaffiliates. 3-Allyl-2-hydroxybenzoic acid c2025 [Available from: <https://www.pharmaffiliates.com/en/42729-96-4-3-allyl-2-hydroxybenzoic-acid-pa270028292.html>.

80. Darbre P. Chapter 1 - What are endocrine disrupters and where are they found? EDC. 2015:3-26.

81. SpecialChem. Diethylhexyl Succinate c2025 [Available from: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/diethylhexyl-succinate>.

82. Europe C. Sodium Myristyl sulfate c2024 [Available from: <https://cosmileeurope.eu/inci/detail/14957/sodium-myristyl-sulfate/>.

83. Ramis R, Castro J, Caballero C, Casasnovas R, Cerrillo A, Vilanova B, et al. How does pyridoxamine inhibit the formation of advanced glycation end products? The role of its primary antioxidant activity. Antioxidants (Basel). 2019;8(9):344.

84. Expert. CIR. Final report of the safety assessment of niacinamide and niacin. Int J Toxicol. 2005;24 Suppl 5:1-31.

85. Lam K, Dinh M, Hung D, Buu N, Dam T, Mai S. Biological activities of thymine extracted from ethyl acetate of *Cordyceps neovolkiana* DL0004 isolated in Vietnam. Res J Biotechnol. 2023;18(8):97-105.

86. Bajoria V. Acetophenone in cosmetics & personal care products 2024 [Available from: <https://periodical.knowde.com/acetophenone-in-cosmetics-personal-care-products/#:~:text=Applications%20in%20the%20Cosmetic%20Industry,-Function&text=Acetophenone%20is%20a%20naturally%20occurring,soaps%2C%20deter>

gents%2C%20and%20lotions.

87. Pubchem. 2-Amino-2-indancarboxylic acid c2024 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/250936>.
88. Teixeira J, Gaspar A, Garrido E, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int*. 2013;2013:251754.
89. Leite P, Bom C, Ribeiro M, Almeida A, Rosado C, Catarina. Exploring stearic-acid-based nanoparticles for skin applications—focusing on stability and cosmetic benefits. *Cosmetics*. 2023;10(4):99.
90. Zhu H, Ao H, Fu Y, Zou C, Chen Z, Jin Z. Optimizing alginate dressings with allantoin and chemical modifiers to promote wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2024;275(1):133524.
91. SpecialChem. Glyoxylic acid c2024 [Available from: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/glyoxylic-acid>.
92. Li Z, Chen B, Ma Y, Li Z, Hua C, Chang J. Enhanced hypoxanthine utilization and antioxidant capacity for cAMP salvage synthesis efficiently by *Arthrobacter* sp. CCTCC 2013431 with glutathione addition. *Biochem Eng J*. 2024;201:109120.
93. Pratomo I, Noor D, Kusmardi K, Rukmana A, Paramita R, Erlina L. Xanthine oxidase-induced Inflammatory responses in respiratory epithelial cells: a review in immunopathology of COVID-19. *Int J Inflam*. 2021;2021:1653392.
94. Pubchem. N-Acetyl-L-aspartic acid c2024 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-L-aspartic-acid>.
95. Tavano L, Aiello R, Ioele G, Picci N, Muzzalupo R. Niosomes from glucuronic acid-based surfactant as new carriers for cancer therapy: preparation, characterization and biological properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;118:7-13.
96. Konn J, Pranovich A, Fardim P, Holmbom B. Characterisation and effects of new anionic groups formed during chemithermomechanical pulping of spruce. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp*. 2007;296(1-3):1-7.
97. Chemical A. Ethyl myristate c2024 [Available from: https://www.atamanchemicals.com/myristyl-myristate_u24784/.

98. Wu L, Hu Z, Luo X, Ge C, Zhan S, Huang W. Itaconic acid alleviates perfluorooctanoic acid-induced oxidative stress and intestinal damage by regulating the keap1/Nrf2/Ho-1 pathway and reshaping the gut microbiota. *Int J Mol Sci*. 2024;25(18):9826.
99. Bradlow R, Berk M, Kalivas P, Back S, Kanaan R. The potential of N-acetyl-L-cysteine (NAC) in the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs*. 2022;36(5):451-82.
100. MedChemExpress. D-(+)-Glucono-1,5-lactone c2024 [Available from: https://www.medchemexpress.com/E_575.html?srsId=AfmBOoow33UeMoV_bOM80E4HOMr1YkqyKB5EvZod6y3CJ6x4ARQDZ66Y.
101. Benjamins J, Murphy E, Seyfried T. Chapter 5 - Lipids. *Basic Neurochemistry* 2012;5:81-100.
102. Wikipedia. Propyl gallate c2024 [Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Propyl_gallate#:~:text=Propyl%20gallate%20is%20an%20anti%20oxidant%20that%20neutralizes%20free%20radicals%2C%20which,an%20antioxidant%20in%20fluorescence%20microscopy.
103. Wang J, An W, Wang Z, Zhao Y, Han B, Tao H, et al. Vanillin has potent antibacterial, antioxidant, and anti-Inflammatory activities In vitro and in mouse colitis induced by multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(12):1544.
104. Actylis. Adenosine: In demand anti-aging agent for cosmetic manufacturers 2021 [Available from: <https://actylis.com/fr/blog/2021/september/adenosine>.
105. Barciszewski J, Rychlewski L, Celewicz L, Ciszewski K, Wyszko E, Rolle K. A method of manufacturing 3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid amide, its application in the manufacture of anti-aging compositions and an anti-aging composition. *WO*. 2007:046721.
106. LinkedIn. Methyl 4-hydroxyphenylacetate CAS 14199-15-6 market size | emerging trends for 2024-2031 c2024 [Available from: <https://www.linkedin.com/pulse/methyl-4-hydroxyphenylacetate-cas-14199-15-6-qbt8e>.
107. Jiang N, Zhao Z. Intestinal aging is alleviated by uridine via regulating inflammation and oxidative stress in vivo and in vitro. *Cell Cycle*. 2022;21(14):1519-31.
108. Xie Z CN, Wang C. A review on β -carboline alkaloids and their distribution in

foodstuffs: a class of potential functional components or not. Food Chem. 2021;348:129067.

109. Chen AC DD. Nicotinamide and the skin. Australasian Journal of Dermatology. 2014;55(3):169-75.

110. Arumugam M, Paal M, Donohue T, Ganesan M, Osna N, Kharbanda K. Beneficial effects of betaine: a comprehensive review. Biology 2021;10(6):456.

111. Wikipedia. Valine c2024 [Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Valine>.

112. Garg S, Gupta J, Sahu D, Liu C. Pharmacological and therapeutic applications of esculetin. Int J Mol Sci. 2022;23(20):12643.

113. Ouchi M, Morit A, Satoh K, Kobayashi S, Terada M, Kon H, et al. Effects of 1,5-anhydro-D-glucitol on insulin secretion both in in vitro and ex vivo pancreatic preparations. J Pharmacol Sci. 2022;149(2):66-72.

114. Leipnitz G, Seminotti B, Haubrich J, Dalcin M, Dalcin K, Solano A, et al. Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex. Neuroscience. 2007;86(3):683-93.

115. Chemical A. 2 6-pyridinedicarboxylic acid c2024 [Available from: <https://atamankimya.com/sayfalar.asp?LanguageID=2&cid=3&id=13&id2=10399#:~:text=2%2C6%2DPyridinedicarboxylic%20acid%20can,fruit%20and%20vegetable%20processing%20plants>.

116. Jiang B, Adams Z, Moonah S, Shi H, Furlow J, Moskovitz J. The antioxidant enzyme methionine sulfoxide reductase A (MsrA) Interacts with Jab1/CSN5 and regulates Its function. Antioxidants 2020;9(5):452.

117. Zhang B, Ying Y, Huang Z, Zhang K, Xu X, Zhao Q, et al. A new δ -valerolactone produced by marine *Streptomyces* sp. YIM 13591. Nat Prod Res. 2022;37(10):1-7.

118. Wells S, Buford M, Migliaccio C, Holian A. Elevated asymmetric dimethylarginine alters lung function and Induces collagen deposition in mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;40(2):179-88.

119. WebMD. Nicotinate c2024 [Available from:

derived co-antioxidant for alpha-tocopherol, inhibiting human low density lipoprotein and plasma lipid peroxidation. J Biol Chem. 1996;271(51):14-21.

129. Gibbs N, Norval M. Urocanic acid in the skin: a mixed blessing? J Invest Dermatol. 2011;131(1):14-7.

130. Express C. Niacinamide N-oxide c2024 [Available from: <https://www.chemimpex.com/products/26992?srltid=AfmBOopL16xdcrSUikd3wv1soNSB4sJaiUXpWWEsCK7vsFOWEuH8nbRn>.

131. Sun Y, Xing J, He X, Wu D, Song C, Liu S, et al. Species diversity, systematic revision and molecular phylogeny of Ganodermataceae (*Polyporales*, *Basidiomycota*) with an emphasis on Chinese collections. . Stud Mycol. 2022;101:287-415.

132. Martin P, Coetea., Seonju M, Vuledzani G, Muthelo., Michael J, et al. *Ganoderma* species,

including new taxa associated with root rot of the iconic jacaranda mimosifolia in Pretoria, South Africa. Ima fungal 2015;6(1):249-56.

133. Jun H, Xiao H, Long L, Xian L, Song T, Mei H, et al. Species diversity of *Ganoderma* (Ganodermataceae, Polyporales) with three new species and a key to *Ganoderma* in Yunnan Province, China. Front Microbiol. 2022;13:1035434.

134. Melinda F, Socaciu M, Salagean C, Farcas A, Sonia A, Socaci., et al. Comparison of different extraction solvents for characterization of antioxidant potential and polyphenolic composition in *Boletus edulis* and *Cantharellus cibarius* mushrooms from Romania. Molecules. 2021;26:7058.

135. Yue Y, Zhaoxi L, Kefeng S, Lunbo L, Min C. Medicinal value of edible mushroom polysaccharides: a review. JFF. 2023;3(1):6-23.

136. Hamza A, Ghanekar S, Santhosh KD. Current trends in health - promoting potential and biomaterial applications of edible mushrooms for human wellness. Food Biosci. 2023;51:102290.

137. Nie S, Zhang H, Li W, Xie M. Current development of polysaccharides from *Ganoderma*: Isolation, structure and bioactivities. BCDF. 2013:10-20.

138. Fahmi H, Sri F. Antioxidant evaluation of *Ganoderma lucidum* extracts. IOP Conf

Ser Mater Sci Eng 2021;1011:012061.

139. Chen R, Liu Z, Zhao J, Chean R, Meng F, Zhang M. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*. . Food Chem. 2011;127(2):434-40.
140. Juliette O, Ndong E, Roger G, Leonid R, Obiang C, Ondo J. Chemical screening, antioxidant potential and antiangiogenic effect of *Microporus Xanthopus* (fr.) Kuntze, *Ganoderma Orbiforme* (fr.) Ryvarden and *Polyporus Fasciculatus* (pat) lloyd, Medicinal Mushrooms from Gabon. Am J Pharm Health Res 2018;6(10):2321.
141. Fernando D, Wijesundera R, Soysa P, Silva D, Nanayakkara C. Strong radical scavenging macrofungi from the dry zone forest reserves in Sri Lanka. . Front Env Microbiol. 2015;1(2):32-8.
142. Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Syn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: targets and efficacy. Biomedicines. 2020;25(8):135.
143. Azieana J, Zainon M, Noriham A, Rohana M. Total phenolic and flavonoid content and antioxidant activities of ten Malaysian wild mushrooms. OALibJ 2017;4:e3987.
144. Bristy AT, Islam T, Ahmed R, Hossain J, Reza HM, Jain P, et al. Evaluation of total phenolic content, HPLC analysis, and antioxidant potential of three local varieties of mushroom: A comparative study. Int J Food Sci. 2022;2022:1-11.
145. Cheung L, Cheung PC, Vincent E. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem. 2003;81(2):249-55.
146. Yongkhamcha B, Khankhum S, Buddhakala N. Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, antibacterial and anti-Inflammatory activities and toxicities of ethanol extracts from *Curcuma mangga*, *Zingiber Officinale* and, *Zingiber Montanum*. Trends Sci. 2024;21(9):8086.
147. Andrejcd D, Knez Z, Marevci M. Antioxidant, antibacterial, antitumor, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and nevro-protective activity of *Ganoderma lucidum*: An overview. Front Pharmacol. 2022;13:934982.
148. Herawati E, Ramadhan R, Ariyani F, Marjenah, Kusuma I, Suwinarti W. Phytochemical screening and antioxidant activity of wild mushrooms growing in tropical

regions. *Biodiversitas*. 2021;22(11):16-21.

149. Ling G, Jia C, Ze Y, Wu Q, Zhang F, Zhi H. Ganoderic acids-rich ethanol extract from *Ganoderma lucidum* protects against alcoholic liver injury and modulates intestinal microbiota in mice with excessive alcohol intake. *CRFS*. 2022;5:515-30.

150. Kaewnarin K, Suwannarach N, Kumla J, Lumyong S. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *J Funct Foods*. 2016;27 352-64.

151. Shahid A, Huang M, Liu M, Shamim M, Parsa C, Orlando R. The medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* attenuates UV-induced skin carcinogenesis and immunosuppression. *PLoS One*. 2022;17(3):e0265615.

152. Taofiq O, Rodrigues F, Barrosa L, Maria F, Barreiroa., Isabel C, et al. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. *FCT*. 127:228-36.

153. Seweryn A. Interactions between surfactants and the skin – theory and practice. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018;256:242-55.

154. Ziemlewska A, Wojciak M, Mroziak L, Zagorska DM, Bujak T, Nizioł T, et al. Assessment of cosmetic properties and safety of use of model washing gels with Reishi, Maitake and Lion's Mane extracts. *Molecules*. 2022;27(16):5090.

155. Cui B, Li H, Ji X, Zhou J, Song J, Si J, et al. Species diversity, taxonomy and phylogeny of Polyporaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Divers*. 2019;97:137–392.

156. Hassan M, Shahzadi S, Kloczkowski A. Tyrosinase inhibitors naturally present in plants and synthetic modifications of these natural products as anti-melanogenic agents: a review. *Molecules*. 2023;28(1):378.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
สารเคมีและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 1% Agarose

Agarose	1	กรัม
0.5X TBE buffer	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมแล้วนำไปต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. 2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) solution

DPPH	0.0039	กรัม
Methanol	50	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. 7 mM ABTS solution

ABTS	0.0192	กรัม
140 mM potassium persulfate	88	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	5	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงในที่มืด แล้วเก็บในขวดสีชา เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยปรับให้มีค่าเท่ากับ 0.7 ก่อนนำมาใช้

4. 2 mM Ferrous chloride (FeCl_2) solution

FeCl_2	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 °C

5. 5 mM Ferrozine solution

Ferrozine	93	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำมาผสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชาในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 °C

6. 0.5 mg/ml MTT solution

5 mg/ml MTT solution	1	มิลลิลิตร
complete medium (DMEM)	9	มิลลิลิตร

นำมาสสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ในหลอดที่มีการห่อด้วยกระดาษฟอยด์ที่อุณหภูมิ 4 °C

7. 7.5% Na₂CO₃ solution

Na ₂ CO ₃	75	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

นำมาสสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ในหลอดที่มีการห่อด้วยกระดาษฟอยด์ที่อุณหภูมิ 4 °C

8. 1:10 Folin ciocateu solution

Folin Ciocateu	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	10	มิลลิลิตร

นำมาสสมกันจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันและเก็บไว้ในหลอดที่มีการห่อด้วยกระดาษฟอยด์ที่อุณหภูมิ 4 °C

9. 10 mM Sodium nitroprusside solution

Sodium nitroprusside	0.0298	กรัม
Phosphate Buffer Saline (PBS) ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	10	มิลลิลิตร

10. 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) solution

NaCl	8	กรัม
KCl	2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดที่อุณหภูมิ 4 °C

11. 0.5 mg/ml of L-tyrosine solution

L-tyrosine	0.03	กรัม
0.025 M Phosphate Buffer (pH 6.8) ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	60	มิลลิลิตร

12. Tyrosinase 100 U/ml solution

Tyrosinase	0.3	มิลลิกรัม
0.025 M Phosphate Buffer (pH 6.8) ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	20	มิลลิลิตร

13. 0.025 M Phosphate Buffer (pH 6.8)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.477	กรัม
--	-------	------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.950	กรัม
---	-------	------

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดที่อุณหภูมิ 4 °C



ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. complete culture medium (DMEM)

1X Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500	มิลลิลิตร
Fetal bovine serum (FBS) heat-inactivated (56 °C, 30 นาที)	50	มิลลิลิตร
Penicillin-Streptomycin	5	มิลลิลิตร

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. cryopreservative medium

Fetal bovine serum (FBS) heat-inactivated (56 °C, 30 นาที)	900	ไมโครลิตร
DMSO (99.9%)	100	ไมโครลิตร

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่ง 200 กรัมมาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 400 มิลลิลิตร เมื่อมันฝรั่งสุกกรองส่วนน้ำมาผสมกับ glucose และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Yeast malt broth (YM broth)

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที



ภาคผนวก ค

ความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดโพลีพอร์ต่อเซลล์ HaCaT ทดสอบด้วยวิธี MTT assay

ตาราง 26 ผลของสารสกัดจากเห็ด *C. dendriformis* PW17-134 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100.00 $\pm$ 0.80ab	99.97 $\pm$ 4.26ab	99.97 $\pm$ 4.26bcd
0.1% DMSO	104.07 $\pm$ 0.26a	102.47 $\pm$ 1.72ab	102.47 $\pm$ 1.72abc
3.9	100.67 $\pm$ 1.83ab	105.46 $\pm$ 1.31a	102.23 $\pm$ 2.48abc
7.8	103.67 $\pm$ 5.71a	102.71 $\pm$ 4.24ab	104.48 $\pm$ 2.19ab
15.6	95.41 $\pm$ 4.92abc	104.89 $\pm$ 3.96a	108.01 $\pm$ 2.85a
31.25	96.96 $\pm$ 4.72abc	106.13 $\pm$ 2.78a	105.92 $\pm$ 1.51ab
62.5	96.63 $\pm$ 5.19abc	101.00 $\pm$ 3.28ab	98.45 $\pm$ 3.31bc
125	89.26 $\pm$ 3.34bc	94.71 $\pm$ 6.03bc	94.87 $\pm$ 0.50cd
250	86.19 $\pm$ 6.62c	84.77 $\pm$ 4.40c	92.62 $\pm$ 6.15d
500	57.33 $\pm$ 1.93d	54.72 $\pm$ 1.69d	58.22 $\pm$ 1.63e

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ตาราง 27 ผลของสารสกัดจากเห็ด *F. aspera* NP17-02 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์เคราตินโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100.00 $\pm$ 0.80a	99.97 $\pm$ 4.26a	99.97 $\pm$ 4.26bc
0.1% DMSO	104.07 $\pm$ 0.26a	102.47 $\pm$ 1.72a	102.47 $\pm$ 1.72ab
3.9	93.48 $\pm$ 10.28a	89.22 $\pm$ 8.76abc	110.07 $\pm$ 0.77a
7.8	100.41 $\pm$ 1.45a	100.71 $\pm$ 5.51a	107.06 $\pm$ 2.58ab
15.6	105.44 $\pm$ 1.07a	101.22 $\pm$ 5.51a	104.89 $\pm$ 5.08ab
31.25	100.44 $\pm$ 0.77a	98.72 $\pm$ 4.35ab	104.53 $\pm$ 2.63ab
62.5	100.30 $\pm$ 3.27a	92.24 $\pm$ 4.00ab	103.96 $\pm$ 1.26ab
125	94.93 $\pm$ 5.11a	83.09 $\pm$ 8.37bc	92.62 $\pm$ 5.81c
250	81.85 $\pm$ 1.96b	73.02 $\pm$ 9.03c	56.35 $\pm$ 5.12d
500	33.52 $\pm$ 1.62c	48.40 $\pm$ 2.39d	7.90 $\pm$ 1.98e

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ตาราง 28 ผลของสารสกัดจากเห็ด *G. lingzhi* PW17-43 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์โคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100.03 $\pm$ 2.10a	100.00 $\pm$ 4.29a	100.63 $\pm$ 4.29ab
0.1% DMSO	92.75 $\pm$ 0.89abc	102.47 $\pm$ 1.73a	103.14 $\pm$ 1.73a
3.9	90.14 $\pm$ 2.79abc	99.92 $\pm$ 1.45a	101.38 $\pm$ 3.04a
7.8	97.78 $\pm$ 12.50ab	104.10 $\pm$ 3.06a	104.75 $\pm$ 0.88a
15.6	96.50 $\pm$ 4.34ab	97.91 $\pm$ 3.52a	114.33 $\pm$ 3.81a
31.25	95.96 $\pm$ 2.47ab	96.93 $\pm$ 9.07ab	104.37 $\pm$ 1.67a
62.5	100.29 $\pm$ 3.99ab	86.56 $\pm$ 2.17bc	102.52 $\pm$ 8.54a
125	87.92 $\pm$ 3.96bc	76.66 $\pm$ 3.67c	79.59 $\pm$ 7.77c
250	81.42 $\pm$ 3.60c	53.56 $\pm$ 3.60d	84.88 $\pm$ 7.51bc
500	53.48 $\pm$ 1.11d	39.41 $\pm$ 1.45e	57.49 $\pm$ 7.52d

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 3$) ตัวอักษร a-e ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ตาราง 29 ผลของสารสกัดจากเห็ด *T. hirsuta* PW17-41 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100 $\pm$ 0.80ab	100.00 $\pm$ 0.80ab	100.00 $\pm$ 0.80bc
0.1% DMSO	104.07 $\pm$ 0.26a	104.07 $\pm$ 0.26a	104.07 $\pm$ 0.26abc
3.9	106.07 $\pm$ 3.79a	105.56 $\pm$ 2.70a	103.41 $\pm$ 4.50abc
7.8	102.07 $\pm$ 5.54ab	108.52 $\pm$ 2.95a	105.41 $\pm$ 0.56ab
15.6	102.74 $\pm$ 2.23ab	108.22 $\pm$ 6.74a	102.81 $\pm$ 4.49abc
31.25	102.44 $\pm$ 2.04ab	104.81 $\pm$ 2.50a	106.52 $\pm$ 3.80ab
62.5	101.85 $\pm$ 5.71ab	105.11 $\pm$ 6.19a	107.11 $\pm$ 0.38ab
125	93.85 $\pm$ 2.76b	102.89 $\pm$ 0.59ab	109.63 $\pm$ 2.60a
250	82.81 $\pm$ 0.26c	93.48 $\pm$ 3.34b	97.70 $\pm$ 0.68c
500	52.30 $\pm$ 0.51d	69.93 $\pm$ 0.68c	71.41 $\pm$ 1.00d

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษร a-d ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ตาราง 30 ผลของสารสกัดจากเห็ด *M. vernicipes* PW17-173 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์
เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100.03 $\pm$ 1.38a	100.03 $\pm$ 1.38a	100.03 $\pm$ 1.38ab
0.1% DMSO	101.01 $\pm$ 0.68a	101.01 $\pm$ 0.68a	101.01 $\pm$ 0.68ab
3.9	98.93 $\pm$ 4.23a	103.15 $\pm$ 0.83a	105.36 $\pm$ 1.01ab
7.8	99.36 $\pm$ 0.95a	103.03 $\pm$ 2.43a	106.76 $\pm$ 0.70ab
15.6	97.28 $\pm$ 2.11a	101.68 $\pm$ 4.37a	100.89 $\pm$ 4.35ab
31.25	95.99 $\pm$ 2.60a	101.93 $\pm$ 2.65a	108.23 $\pm$ 1.40a
62.5	96.73 $\pm$ 5.76a	102.42 $\pm$ 2.61a	106.09 $\pm$ 2.13ab
125	90.54 $\pm$ 4.69a	104.38 $\pm$ 2.63a	101.32 $\pm$ 7.73ab
250	75.18 $\pm$ 6.49b	90.85 $\pm$ 1.78b	96.54 $\pm$ 4.51b
500	44.20 $\pm$ 5.08c	52.65 $\pm$ 3.72c	74.63 $\pm$ 4.97c

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษร a-c ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ตาราง 31 ผลของสารสกัดจากเห็ด *M. xanthopus* PP17-16 ต่อการรอดชีวิตของเซลล์
เคราติโนไซต์ HaCaT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารสกัด ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละการรอดชีวิต		
	สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ		สารสกัดจากเส้นใย
	BA	BE	ME
Control	100.03 $\pm$ 1.38a	100.03 $\pm$ 1.38a	100.03 $\pm$ 1.38ab
0.1% DMSO	101.01 $\pm$ 0.68a	101.01 $\pm$ 0.68a	101.01 $\pm$ 0.68b
3.9	102.36 $\pm$ 4.24a	107.13 $\pm$ 5.31a	105.30 $\pm$ 3.65ab
7.8	105.42 $\pm$ 2.26a	104.74 $\pm$ 4.58a	109.46 $\pm$ 2.41ab
15.6	98.01 $\pm$ 8.13a	108.36 $\pm$ 2.57a	107.07 $\pm$ 5.24ab
31.25	103.58 $\pm$ 5.10a	103.34 $\pm$ 6.47a	109.95 $\pm$ 4.50a
62.5	106.34 $\pm$ 3.43a	103.46 $\pm$ 6.80a	108.54 $\pm$ 5.27ab
125	103.52 $\pm$ 10.43a	48.97 $\pm$ 3.18b	103.09 $\pm$ 1.70ab
250	81.54 $\pm$ 9.81b	12.98 $\pm$ 2.47c	80.75 $\pm$ 4.34c
500	52.83 $\pm$ 1.75c	9.67 $\pm$ 0.21d	48.18 $\pm$ 1.22d

หมายเหตุ: ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษร a-d ในตารางแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละการทดลองตามคอลัมน์ที่ $p < 0.05$ โดยใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เบญจวรรณ กรินทร์
วัน เดือน ปี เกิด	-
สถานที่เกิด	-
วุฒิการศึกษา	-
ที่อยู่ปัจจุบัน	-
ผลงานตีพิมพ์	-
รางวัลที่ได้รับ	-

