รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ด จากพื้นที่ศึกษาวิจัยสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และการคัดเลือกเห็ดที่มีศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์ (Biodiversity of Mushroom in the research area of Khao Kheow Open Zoo, Chonburi province and selection of the potential species for applications)

คณะผู้ดำเนินงาน
ผศ. ดร. อรวรรณ สัตยาลัย, ผศ. ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
อ. ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ, นางสาว ละม้าย แก้วเนิน
นางสาว วิชาณี แบนคีรี, นางสาว ปรางวลัย จันทร์แจ่ม
ภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และการคัดเลือกเห็ดที่มีศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์

(Biodiversity of Mushroom in the research area of Khao Kheow Open Zoo, Chonburi province and selection of the potential species for applications)

คณะผู้ดำเนินงาน
ผศ. ดร. อรวรรณ สัตยาลัย[1]
ผศ. ดร. สีหนาท ประสงค์สุข[2]
อ. ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ[2]
นางสาว ละม้าย แก้วเนิน
นางสาว วิชาณี แบนคีรี
นางสาว ปรางวลัย จันทร์แจ่ม

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และสวนสัตว์เปิดเขาเขียว องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานรวมทั้งเจ้าหน้าที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียวทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

การศึกษาเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในปี พ.ศ. 2552-2553 เป็นการศึกษาที่เน้นทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในพื้นที่ทำการศึกษา พบว่าจากการออกภาคสนามรวม 5 ครั้งสามารถเก็บตัวอย่างได้ 146 ตัวอย่าง สามารถจัดจัดจำแนกถึงระดับสกุล (genus) ได้ 1 ตัวอย่าง และจัดจำแนกถึงระดับสายพันธุ์ (species)ได้ 4 ตัวอย่างและพบว่าเห็ดส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่มีดอกเนื้อแข็งคล้ายหนังสัตว์ (Polypores) และการออกภาคสนามในปีพ.ศ. 2554 1ครั้ง เก็บตัวอย่างเห็ดได้ 19 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกถึงระดับสายพันธุ์ได้ 2 ตัวอย่าง และพบว่าเห็ดส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่มีดอกเนื้อแข็งคล้ายหนังสัตว์เช่นกัน

จากตัวอย่างเห็ด 146 ตัวอย่างสามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 22 ตัวอย่าง นำเส้นใยบริสุทธิ์จาก 8 ตัวอย่าง และจากดอกเห็ด 1 ตัวอย่าง มาสกัดสารพอลิแซ็คคาร์ไรด์ด้วยน้ำร้อนโดยใช้เครื่องสกัดซอกห์เลต วัดปริมาณสารพอลิแซ็คคาร์ไรด์ในสารสกัดด้วยวิธีอันโทรน เลือกสารสกัดที่ปริมาณสารพอลิแซ็คคาร์ไรด์สูง 6 ตัวอย่างมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากตัวอย่าง KK 76 มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ที่ 88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำดอกของเห็ดที่สารสกัดมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งมาศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพื่อจัดจำแนกชนิดพบว่าเป็นชนิด *Microporus xanthopus* ซึ่งมีชื่อเรียกภาษาไทยว่า เห็ดกรวยทองตะกู

ส่วนตัวอย่างเห็ดจากการออกภาคสนามในปี 2554 จำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 2 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาเพื่อจัดจำแนกพบว่าเป็นเห็ดกรวยทองตะกู *(Microporus xanthopus)* 1 ตัวอย่าง และอีกตัวอย่างพบว่าเป็นเห็ดหลินจือ *(Ganoderma lucidum)* ซึ่งเป็นที่รู้จักและมีการใช้กันแพร่หลาย จากการศึกษาครั้งนี้เชื่อว่าสารสกัดพอลิแซ็คคาร์ไรด์ จาก *M. xanthopus* จะสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในรักษาโรคมะเร็งร่วมกับวิธีการรักษาอื่นๆได้

คำสำคัญ: ความหลากหลาย เห็ด สวนสัตว์เปิดเขาเขียว สารพอลิแซ็คคาร์ไรด์ เซลล์มะเร็ง

Abstract

One hundred and forty six mushroom samples were collected from 5 times field survey on mushroom biodiversity during 2009-2010 in the research area of Khao Kheaw open zoo, Chonburi province. The collected samples were identified based on their external morphological characteristics. One genus and 8 species were identifiable from all the samples. Most of the mushroom samples from the area studied belong to the Polypores group. Nineteen mushroom samples were collected from a field survey in 2011 and two samples were identifiable to species level and most of these samples also belong to the Polypores group.

Twenty two mycelia isolates were obtained from 146 samples. The pure mycelium culture from 8 samples and 1 fruiting body were used for polysaccharide extraction by hot water in Soxhlet apparatus. Polysaccharide content in each samples were assessed using anthrone test method. Six samples with high polysaccharide content were selected and tested for their biological activities against lung cancer cell line at concentration of 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 and 1.00 mg/ml respectively. The crude extract from KK 76 revealed highest inhibitory activity against lung cancer cell line of 88% at the concentration of 1.00 mg/ml and show 5% cell inhibitory at 0.35 mg/ml. The KK 76 were subsequently identify using morphological examination including macroscopic and microscopic observation and was successfully identified as *Microporus xanthopus*

Two pure mycelia isolates were obtained from nineteen mushroom samples collect in 2011.They were identified as *Microporus xanthopus* and *Ganoderma lucidum*, a well known mushroom. This research suggested that polysaccharides from *Microporus xanthopus* can be potentially developed and applied for cancer treatment.

Keyword: biodiversity, mushroom, Khao Kheow Open Zoo, polysaccharide, cancer cell

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	7
ผลการศึกษา	11
สรุปและวิจารณ์ผล	29
เอกสารอ้างอิง	32
ประวัตินักวิจัยและคณะ	34

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2553	11
ตารางที่ 2	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 9 ตัวอย่าง	17
ตารางที่ 3	การเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี วันที่ 25 มิ.ย. 2554	24
ตารางที่ 4	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจาก KK14/54 และ KK17/54	28
ตารางที่ 5	การแบ่งกลุ่มตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 25 มิ.ย. 2554	28

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 วันที่ 17 ธ.ค. 2552	12
ภาพที่ 2	ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 วันที่ 26 ก.พ. 2553	12
ภาพที่ 3	ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 วันที่ 10 เม.ย. 2553	13
ภาพที่ 4	ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 วันที่ 20 มิ.ย. 2553	13
ภาพที่ 5	ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 วันที่ 10 ก.ค. 2553	14
ภาพที่ 6	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14, KK16, KK26 และ KK54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA เป็นระยะเวลา 3-5 วัน	14
ภาพที่ 7	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK60, KK76, KK98 และ KK139 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA เป็นระยะเวลา 3-5 วัน	15
ภาพที่ 8	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14, KK16 , KK26และ KK54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB	15
ภาพที่ 9	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK60, KK76, KK98 และ KK154 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB	16
ภาพที่ 10	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ก่อนนำไปอบ	16
ภาพที่ 11	สารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง	17
ภาพที่ 12	ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	18
ภาพที่ 13	ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	19
ภาพที่ 14	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างต่างๆ	19
ภาพที่ 15	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง KK 76 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	20
ภาพที่ 16	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Microporus xanthopus* (A-D) ลักษณะของดอก (D-E) ผิวหมวกดอก (6.3X, 40X) (F) ผิวใต้หมวกดอก (40x) (G-H) ลักษณะเส้นใยบริเวณผิวใต้หมวกดอก (400X, 1000X)	22
ภาพที่ 17	ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 25 มิ.ย. 2554	25
ภาพที่ 18	ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14/54 และ KK17/54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA	26
ภาพที่ 19	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Ganoderma lucidum* (A-C) ลักษณะของดอก (D-E) ลักษณะผิวใต้ดอก (40X) (F-G) สปอร์ (400X, 1000X)	27

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. มะเร็งและสาเหตุของการเกิดมะเร็ง

มะเร็ง (cancer) คือกลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ร่างกายมีความผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติ ในที่สุดทำให้เกิดการตายของเซลล์เหล่านั้น โดยปกติแล้วเซลล์ร่างกายทั่วไปจะมีการแบ่งเซลล์ประมาณ 50 ถึง 70 ครั้ง จึงจะเข้าสู่การตายของเซลล์ในกระบวนการเจริญปกติ (apoptosis) แต่เซลล์มะเร็งนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ไม่สิ้นสุด (immortal) และสามารถบุกรุกไปทำลายเซลล์ข้างเคียงได้อีกด้วย (metastasis) สำหรับสาเหตุของการเกิดมะเร็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย ได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม สารพิษจากเชื้อราที่มีชื่อว่า อัลฟาทอกซิน (alfatoxin) สารก่อมะเร็งพวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ที่เกิดจากการปิ้งย่าง สีผสมอาหารที่มาจากสีย้อมผ้า รังสีเอ็กซเรย์ (X-ray) และรังสีอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) จากแสงแดด การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพบพิลโลมา (human papilloma viruses) การสูบบุหรี่และการดื่มสุรา เป็นต้น (Daba และ Ezeronye, 2003) และเกิดจากความผิดปกติภายในร่างกายที่สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของยีน (gene) ที่มีบทบาทในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ 2 ชนิด คือ ทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressors gene) และออนโคยีน (oncogene) โดยออนโคยีนนั้นเป็นยีนที่มีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวและทำให้เกิดวัฏจักรของเซลล์ (cell division) แต่การทำงานของออนโคยีนจะถูกควบคุมโดยทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีน เพราะฉะนั้นเมื่อสารพันธุกรรมของทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีนมีความผิดปกติ ก็จะทำให้การทำงานของยีนดังกล่าวไม่สามารถควบคุมการทำงานของออนโคยีนได้ ทำให้การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนควบคุมไม่ได้และเกิดเป็นมะเร็งดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น (Gibbs, 2003)

2. วิธีการที่ใช้ในการรักษามะเร็งในปัจจุบัน

1) การรักษามะเร็งโดยวิธีศัลยกรรม (surgery) หรือการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อที่เป็นมะเร็งออกโดยตรง

2) การรักษามะเร็งโดยวิธีรังสีรักษา (radiotherapy) คือการฉายรังสีไปยังบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งอยู่โดยตรงเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง วิธีนี้มักจะทำร่วมกับวิธีการทางศัลยกรรม

3) การรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด (chemotherapy) คือการรักษาหรือการทำลายเซลล์มะเร็งที่ที่ได้กระจายแหล่งกำเนิดไปตามท่อน้ำเหลือง กระแสเลือดหรืออวัยวะอื่นของร่างกาย เป็นการรักษามะเร็งแบบทั้งตัวของผู้ป่วยมะเร็ง โดยการรับประทานยาที่ประกอบด้วย สารเคมีที่มีความสามารถในการฆ่าหรือทำลายเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง เป้าหมายของการใช้ยาในการรักษาก็คือใช้ยาในการรักษาในปริมาณที่น้อยแต่มีประสิทธิภาพสูงในการในการทำลายเซลล์มะเร็ง และให้มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติ (normal cell) ของร่างกายน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ สำหรับตัวยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ แอสไพริน (aspirin) ไพรอกซิแคน (piroxican) อินโดเมทาซิน (indomethacin) เป็นต้น ตัวยาเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไซโคลออกซิจิเนส (cyclooxygenase หรือ COX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเปลี่ยนกรดอะราชิโดนิค (arachidonic acid) ไปเป็นสารโพรสตาแกรนดิน (prostaglandin) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Jang et al., 1997; Wasser and Weis, 1999) แต่การรักษาด้วยวิธีนี้มักจะมีผลข้างเคียงตามมาด้วยคือ เซลล์ปกติจะถูกทำลายไปบางส่วน

4) การรักษาโดยใช้ฮอร์โมน (hormone) เป็นวิธีการรักษาที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก จึงไม่ค่อยนิยมนำวิธีนี้มาใช้ในการรักษามากนัก เช่น ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมในวัยหลังหมดประจำเดือน จะมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีนี้ดีมาก เมื่อผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกไปแล้ว เป็นต้น

5) การรักษาโดยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เป็นวิธีการรักษาที่นำสารสกัดต่างๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สูงขึ้น เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด เป็นต้น วิธีนี้มักจะทำการรักษาร่วมกับวิธีเคมีบำบัด ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงที่จะเกิดกับเซลล์ปกติของร่างกายได้ แต่การรักษาโดยวิธีการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายนี้ยังอยู่ระหว่างการศึกษาและต้องการข้อมูลอีกมากเพื่อยืนยันว่าได้ผลในการรักษามะเร็ง

6) การรักษาที่ยีนที่ผิดปกติและทำให้เกิดมะเร็งโดยตรง เป็นวิธีการรักษาในอนาคตที่นักวิทยาศาสตร์กำลังคิดค้น โดยพยายามกำจัดยีนที่มีโอกาสหรือมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งออกไป แต่วิธีนี้เป็นวิธีการที่ยากที่สุดและไม่นิยมนำมาใช้มากนัก เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและการเกิดมะเร็งก็ไม่ได้ขึ้นอยู่กับยีนแค่เพียงยีนเดียว แต่เกิดจากยีนหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน

3. เห็ด

เห็ด (mushroom) คือกลุ่มราที่มีเส้นใยซึ่งสามารถรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างหรือดอก (fruiting body) ขนาดใหญ่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าอันเป็นที่เกิดของเซลล์สืบพันธุ์หรือสปอร์ (spore) โครงสร้างหรือดอกนี้มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกันมากมายหลายแบบ เห็ดสามารถจัดจำแนกไว้ใน 2 ไฟลัม (phylum) คือ เบซิดิโอไมโคตา (basidiomycota) และแอสโคไมโคตา (ascomycota) แต่ส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัมเบซิดิโอไมโคตา ซึ่งเป็นพวกที่สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) ที่มีชื่อ เบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) สปอร์ชนิดนี้เกิดอยู่ภายนอกโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายกระบองเรียกว่า เบซิเดียม (basidium) และพบเห็ดบางชนิดในไฟลัมแอสโคไมโคตา ซึ่งมีสปอร์ที่เกิดแบบอาศัยเพศเรียกว่า แอสโคสปอร์ (ascospore) เกิดอยู่ภายในโครงสร้างรูปร่างคล้ายรูปร่างคล้ายถุงเรียกว่าแอสคัส (ascus) ทั้งเบซิดิโอสปอร์ เบซิเดียม แอสโคสปอร์และแอสคัส มีขนาดเล็กมาก ต้องศึกษาภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์จึงจะสังเกตได้ ดอกเห็ดมีชีวิตอยู่ไม่นานก็ตาย แต่เส้นใยของเห็ดที่เจริญอยู่ในดิน เศษซากพืช ซากสัตว์ หรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น พืชและแมลง สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นปีหรือหลายปี และสามารถสร้างดอกเห็ดดอกใหม่ได้อีกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551)

สำหรับประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายและปริมาณของเห็ดเป็นจำนวนมากทั้งเห็ดพื้นถิ่นซึ่งมีทั้งที่กินได้และที่เป็นพิษ แม้จะมีผู้ทำการศึกษาเรื่องชนิดของเห็ดไว้บ้างแต่ก็ยังไม่ครอบคลุมในอีกหลายพื้นที่ ประกอบกับการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ยังมิได้สนใจในการนำสารสกัดจากเห็ดมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งและนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆอีกต่อไป

4. สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากเห็ดการรักษาโรคมะเร็ง

ประเทศในภูมิภาคเอเชียโดยเฉพาะจีนกับญี่ปุ่น ได้มีการศึกษาและนำเห็ดหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma lucidum, Lentinus edodes* และ *Tremela fuciformis* เป็นต้น มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งร่วมกับวิธีการทางเคมีบำบัด โดยใช้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่พบได้ในเห็ดเหล่านั้น ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) โปรติโอไกลแคน (proteoglycans) โปรตีน (proteins) และเลคติน (lectin) เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถพบได้ทั้งในดอกเห็ด เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดและสปอร์ ในปัจจุบันพบว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการต้านการเจริญเติบโต

ของเซลล์เนื้องอกและเซลล์มะเร็ง (antitumor and anticancer) และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (immunomodulating properties) ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) เซลล์มาโครฟาจ (macrophages) เป็นต้น ให้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารดังกล่าวมักจะไม่มีผลข้างเคียงและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Zhang et al., 2007)

5. พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด

พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นสารที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) หลายชนิด และยึดติดกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkages) พบได้บนผนังเซลล์ของเห็ดเป็นส่วนใหญ่ มีทั้งที่สามารถละลายน้ำได้และละลายไม่ได้ โดยพวกที่สามารถละลายน้ำได้มักจะเป็นองค์ประกอบที่จับตัวกันเป็นโครงสร้างภายนอกที่สัมผัสกับสิ่งต่างๆ สามารถสกัดออกมาได้ง่ายกว่าพวกที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จับตัวกันอยู่ภายใน (Wessels and Sistsman, 1979) น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากและเป็นโครงสร้างหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในเห็ดคือกลูโคส โดยจะต่อกันเป็นเส้นตรงสายยาวสลับกันไปมาที่เรียกว่า เบต้ากลูแคน (β-Glucans) จากนั้นจะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น กาแลคโทส (galactose) แมนโนส (mannose) อะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) เป็นต้น มาต่อเป็นกิ่งก้านสาขาไม่มีที่สิ้นสุด เรียกว่าเฮทเทอโรกลูแคน (heteroglucans) ซึ่งพบได้หลายรูปแบบแล้วแต่ชนิดของเห็ด นอกจากนั้นพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่พบก็จับตัวกับโปรตีน เรียกสารประกอบพวกนี้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์-โปรตีนคอมเพล็กซ์ (polysaccharide-protein complex) ความหลากหลายของโครงสร้างเหล่านี้ยังส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งด้วย (Wasser, 2002) ปัจจุบันมีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและนำมาใช้ในการรักษามะเร็งแล้วหลายชนิด ดังต่อไปนี้

1. เลนติแนน (lentinan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดกลุ่มกินได้สายพันธุ์ *Lentinus edodes* มีโครงสร้างเป็นเบต้า (1,3) กลูแคนหรือเบต้า (1,6) กลูแคนก็ได้ โดยพบเป็นครั้งแรกว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ที่ปลูกถ่ายเข้าไปใน Swiss albino mice (Chihare et al., 1970) นอกจากนี้ยังเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดแรกที่พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งและได้มีการนำมาใช้ร่วมกับวิธีเคมีบำบัดอย่างแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่น โดยมีการนำเลนติแนนไปใช้ร่วมกับยาในกลุ่ม tegafur เพื่อรักษาะมะเร็งกระเพาะและมะเร็งลำไส้ พบว่าผู้ป่วย 19.5 เปอร์เซ็นต์มีอายุยืนขึ้นมากกว่า 1 ปี ผู้ป่วย 10.4 เปอร์เซ็นต์ มีอายุยืนขึ้นมากกว่า 2 ปี และ ผู้ป่วย 6.5 เปอร์เซ็นต์ อายุยืนขึ้นมากกว่า 3 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Furue et al., 1981 และ Taguchi et al., 1985) และยังพบอีกว่าช่วยลดอาการบางอย่างที่เกิดจากผลข้างเคียงของยาได้อีกด้วย เช่น อาการผมร่วง เป็นต้น

2. Active Hexose Correlated Compound (AHCC) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดออกมาจากอาหารเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดหลายสายพันธุ์รวมกัน รวมไปถึงเส้นใยบริสุทธิ์ของ *Lentinus edodes* ด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ได้มีการนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเป็นครั้งแรกในปี 1992 โดยสามารถลดการเจริญของมะเร็งตับหลังจากการผ่าตัด 1 ปี ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ (Kamiyama, 1992) ปัจจุบันมีการตั้งศูนย์วิจัยสำหรับสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ในประเทศญี่ปุ่น เพราะนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าการผสมผสานของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะทำให้สามารถรักษามะเร็งได้อีกหลายชนิด

3. Grifan-D เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากกลุ่มเห็ดกินได้สายพันธุ์ *Grifola frondosa* ซึ่งสามารถสกัดได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูงมาก โดยนำมาทดสอบครั้งแรกกับเซลล์มะเร็งตับที่ถ่ายเข้าไปในหนูไมซ์ และ

สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และได้มีการนำมาใช้ในการรักษาร่วมกับวิธีทางเคมีบำบัดอย่างแพร่หลายในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา (Nanba, 1995)

6. กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง

กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการต้านเซลล์มะเร็งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบหลักๆ ได้แก่

1. กระตุ้นการสร้างสารบางชนิดที่ใช้ในการป้องกันการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (cancer preventing activity)

สำหรับกลไกการทำงานรูปแบบนี้มีการทำการทดลองในหนูไมซ์ โดยให้อาหารที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ แล้วทำการถ่ายเซลล์มะเร็งตับเข้าไปในตัวหนู พบว่าหนูที่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ก่อนทำการถ่ายเซลล์มะเร็ง เป็นมะเร็งน้อยลงกว่าหนูที่ไม่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์มาก่อน แต่กลไกการทำงานรูปแบบนี้ยังหาข้อพิสูจน์ได้ค่อนข้างยาก (Ikekawa, 2001)

2. การกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สูงขึ้น (immune-enhancing activity)

เป็นกลไกที่พอลิแซ็กคาไรด์ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งปัจจุบันเป็นกลไกที่ได้รับการยอมรับและพิสูจน์ได้ โดยการให้สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์แก่หนูไมซ์ไร้ขน (Nude mice) ที่ได้รับการถ่ายเซลล์มะเร็ง พบว่าหากหนูไมซ์ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากได้รับเซลล์มะเร็งแล้วจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งได้เลย แต่หากหนูไมซ์ได้รับสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ก่อนได้รับการถ่ายเซลล์มะเร็ง จะพบอัตราการเกิดเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์เลย (Maeda และ Chihara, 1971) สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลไกการทำงานรูปแบบนี้ที่ได้รับการศึกษาและพิสูจน์มาแล้วเป็นจำนวนมากคือ เลนติแนน โดยแลนติแนนจะไปกระตุ้นการทำงานของ tumor necrosis factor (TNFα), interleukin-1, interlukin-3, interferon (ITF), Natural Killer cell และ cytotoxic T lymphocytes ให้มีจำนวนมากขึ้นและเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น

3. การเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงของพอลิแซ็กคาไรด์

นักวิทยาศาสตร์อธิบายไว้ว่าบนเซลล์มะเร็งอาจจะมีตัวรับบนเซลล์ (receptor) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อพอลิแซ็กคารด์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตัวรับ ไปจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์มะเร็ง อาจจะไปมีผลต่อเนื่องกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ในกระบวนการเจริญปกติ (apoptosis) กลไกรูปแบบนี้เป็นกลไกที่นักวิทยาศาสตร์ต้องการมากที่สุด แต่ก็ยังพิสูจน์ได้ไม่ชัดเจนเช่นกัน

7. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยครั้งนี้

ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้ทำการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งจากเห็ดหมื่นปี [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst] โดยนำเส้นใยหรือดอกเห็ดมาสกัดด้วยน้ำร้อน ตกตะกอนด้วยเอธานอล แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่นำไปปลูกถ่ายในหนูไมซ์ไร้ขน พบว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากทั้งจากเส้นใยหรือดอกเห็ดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวในหนูสูงมาก และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้โดยการฉีดให้หนูไมซ์ไร้ขน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูไมซ์ไร้ขนไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วัน

Chung et al. (2001) ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma lucidum* กับเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 24.04 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการบ่มสารสกัดดังกล่าวกับ human T cell line (H9) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ดังกล่าวได้จาก 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในเวลา 4 วัน นับเป็นข้อสนับสนุนทางอ้อมว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดสายพันธุ์ *G. lucidum* ช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด และทดสอบสารสกัดหยาบจาก *G. lucidum* ต่อเซลล์ปอดปกติของมนุษย์ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารสกัดหยาบจาก *G. lucidum* มีผลเพียงเล็กน้อยต่อเซลล์ปกติ

Nie et al. (2006) ทำการแยกสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำชนิดกลูแคนซัลเฟต (glucan-sulfate) จากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดสายพันธุ์ *Grifola frondosa* ซึ่งมีมวลโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน และมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 16.4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งกระเพาะ (SGC-7901) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 และเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกถ่ายเข้าไปใน Kunming mice พบว่ามีการกระตุ้นการสร้างเซลล์ดังกล่าวมากขึ้น

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

1. สถานที่เก็บตัวอย่างเห็ด
   พื้นที่ศึกษาวิจัย ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัด ชลบุรี
2. สถานที่วิเคราะห์ชนิด จัดจำแนกตัวอย่างเห็ด การแยกเส้นใยบริสุทธิ์ การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด การสกัดสารพอลิแซกคาไรด์จากเห็ด
   หน่วยปฏิบัติงานวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. สถานที่ทำการวิจัยเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง
   ห้องปฏิบัติการวิจัยชีววิทยาการเจริญ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเก็บรวบรวมและศึกษาความหลากหลายของเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี
2. เพื่อคัดเลือกเห็ดที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์
3. เพื่อทำการสกัดสารสำคัญจากเห็ด เช่น พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดที่เก็บได้
4. เพื่อทดสอบฤทธิ์และประสิทธิภาพของสารสำคัญในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพ
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดบางชนิดที่พบในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในพื้นที่ทำการศึกษาจะช่วยให้มีข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับเห็ดทั้งที่มีพิษและที่กินได้ในประเทศไทย ซึ่งจะช่วยเพิ่มเติมข้อมูลเกี่ยวกับเห็ดที่พบในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี
2. มี culture collection ของเห็ดและเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดที่ได้ทำการศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง/หรือเปรียบเทียบ

3. สามารถเผยแพร่ข้อมูลในรูปแบบการแสดงนิทรรศการ/หรือการฝึกอบรมเพื่อช่วยให้ประชาชนในท้องถิ่นได้มีความรู้เกี่ยวกับเห็ดพื้นถิ่นที่กินได้ เห็ดมีพิษ และเห็ดที่มีประโยชน์ในด้านอื่น
4. สามารถสกัดสารสำคัญจากเห็ดที่น่าสนใจ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากเห็ดพื้นถิ่น
5. มีบทความวิจัย อย่างน้อย 1 เรื่อง รายงานการวิจัย อย่างน้อย 1 เรื่อง

วิธีดำเนินการศึกษา

1.เตรียมอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่าง

การจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเห็ด ได้แก่

1.1 ถุงกระดาษหลายขนาดสำหรับเก็บตัวอย่างเห็ด

1.2 อุปกรณ์ในการปิดถุงและเขียนหมายเลขกำกับและแหล่งที่พบ

1.3 มีดทั้งขนาดเล็กเพื่อแซะตัวอย่างเห็ดออกมาจากเนื้อไม้ที่เห็ดขึ้นอยู่ และมีดพร้าเพื่อตัดกิ่งไม้บางส่วนที่เห็ดบางชนิดขึ้นอยู่และไม่สามารถแยกออกจากเนื้อไม้ได้

1.4 กล้องถ่ายภาพเพื่อใช้บันทึกตัวอย่างที่มีอยู่ในธรรมชาติ

2. งานภาคสนาม ได้แก่ การเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่วิจัยของโครงการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างเห็ดตามช่วงเวลาต่างๆตลอดทั้งปี

2.1 ในการเก็บตัวอย่างหลังทำการบันทึกภาพและข้อมูลในบริเวณที่พบเห็ดแล้ว ใช้มีดบางหรือเสียมขนาดเล็กแซะเห็ดจากพื้นที่

2.2 เก็บตัวอย่างเห็ดในถุงกระดาษที่มีขนาดใหญ่กว่าเห็ดพอสมควรเพื่อป้องกันการชื้นแฉะมากเกินไปเห็ดจนเน่าเสีย รวมทั้งการทับหรือกระแทกซึ่งจะทำให้ตัวอย่างเห็ดเสียหายได้ เก็บตัวอย่างเห็ดในถุงกระดาษลงในถุงขนาดใหญ่ ระมัดระวังการทับกันของตัวอย่าง

3. **งานในห้องปฏิบัติการ** ได้แก่ เมื่อนำตัวอย่างเห็ดทั้งหมดมาถึงห้องปฏิบัติการของ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ แบ่งตัวอย่างเห็ดที่ได้ทำการศึกษา 2 เรื่อง

3.1 <u>จัดจำแนกตัวอย่างที่เก็บได้ให้ได้รายละเอียดอย่างน้อยถึงระดับสกุล</u> โดยการบันทึกภาพ และข้อมูลรายละเอียดลักษณะทางสัณฐานของก้านดอก ตัวดอกและลักษณะสำคัญอื่นๆ จากนั้นศึกษาลักษณะสปอร์ของเห็ดจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และคุณสมบัติในการติดสี Melzer's reagent ของสปอร์ นำลักษณะต่างๆที่พบไปตรวจสอบเพื่อทำการจัดจำแนกโดยอ้างอิงจากตำราและปรึกษาขอความเห็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านเห็ดและรา (อ. อนิวรรต์ เฉลิมพงษ์) ทั้งนี้ทุกตัวอย่างพยายามจัดจำแนกให้ได้อย่างน้อยถึงระดับสกุล (Genus) ตัวอย่างเห็ดส่วนหนึ่งนำมาอบแห้งไว้เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อ โดยนำดอกเห็ดมาอบในตู้อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียสประมาณ 48 ชั่วโมงถึง 1 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างที่อบแห้งแล้วในกล่องพลาสติก กล่องกระดาษหรือถุงกระดาษ พร้อมบันทึกข้อมูลรายละเอียดประกอบ

3.2 ตัวอย่างเห็ดอีกส่วนหนึ่งนำมา<u>แยกเส้นใยบริสุทธิ์</u> เพื่อขยายให้ได้เส้นใยปริมาณที่มากพอ เพื่อความสะดวกในการสกัดสารสำคัญ โดยนำสปอร์ของเห็ดมาเพาะให้งอกเป็นเส้นใยใน PDA (potato dextrose agar) และทำการแยกเส้นใยต่อเนื่อง หากมีการปนเปื้อนกันอยู่จนกระทั่งได้เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดเพียงชนิดเดียว โดยมีลำดับขั้นตอนรายละเอียดดังนี้

3.2.1 นำดอกเห็ดมาเช็ดผิวด้านนอกด้วยเอทานอล (70%) ในตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ใช้มีดผ่าตัดที่ทำความสะอาดด้วยเอทานอล (95%) และผ่านการลนไฟเฉือนเนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร นำชิ้นตัวอย่างเห็ดที่ได้มาวางบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่มีอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ผสม Rose Bengal (0.01%) ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5-6.5 และ Chloramphenical (50 µg/ml) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนมา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เส้นใยของเห็ดที่เจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อประมาณ 3-5 วัน สังเกตการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นทุกวัน หากมีการปนเปื้อนทำการแยกเส้น

ใยที่เจริญออกมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (subculture) กระทั่งได้เส้นใยบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ในน้ำกลั่นปลอด เชื้อเพื่อให้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

3.2.2 สำหรับเห็ดที่แยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้แล้ว นำมาจัดทำเป็นคลังเชื้อ (Culture collection) เพื่อเก็บรวบรวมเป็นฐานข้อมูลและเพื่อนำมาขยายเพิ่มปริมาณใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

-นำตัวอย่างเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดแช่เยือกแข็ง (20° C) เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อกำจัดแมลงอาจที่ติดมาด้วย จากนั้นนำตัวอย่างเส้นใยบริสุทธิ์มาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (60 °C) เป็นเวลา 2-3 วัน นำตัวอย่างที่แห้งเก็บในกล่องพลาสติก บันทึกรายละเอียดต่างๆเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาต่อไป

3.3 การสกัดสารสำคัญจากเห็ด ทำโดยการนำเส้นใยบริสุทธิ์ที่แยกได้มา เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เจาะชิ้นวุ้นอาหารที่บริเวณปลายเส้นใย และนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย 5 ชิ้น ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) ค่าความเป็นกรดด่าง 5±0.2 ต่อปริมาณ 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียส แรงดัน 151 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง (stationary culture) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 20 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใย ทำการกรองเอาเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำเส้นใยไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (60 °C) เป็นเวลา 2-3 วัน นำเส้นใยที่แห้งหรือดอกเห็ดที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบด (blender) ให้ละเอียดเป็นผง ทำการสกัดแบบหยาบ (crude extraction) ผงเห็ดที่ได้ด้วยน้ำร้อนในอัตราส่วน ผงจากเส้นใยหรือผงดอกเห็ด 1 กรัมต่อน้ำ 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องสกัดซอกห์เลต (Soxhlet apparatus) นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านเมมเบรน (0.2 µm) และเก็บส่วนของเหลว (supernatant) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีอันโทรน (Anthrone assay) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อปริมาณของสารสกัดหยาบ และความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักของเส้นใยบริสุทธิ์

3.4 ตรวจสอบปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีอันโทรน anthrone assay เตรียมสารละลายอันโทรน (anthrone) โดยชั่งสารอันโทรน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 96-98 เปอร์เซ็นต์ (conc. H_2SO_4 96-98 %) จำนวน 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการผสมสารสกัดจากเห็ดที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตรให้เข้ากันดีกับสารละลายอันโทรน 2.5 มิลลิลิตร สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที หากในสารสกัดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดจากเห็ด โดยเทียบจากกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำการตรวจสอบปริมาณสารพอลิแซคคาร์ไรด์ด้วยวิธีการเดียวกัน

3.5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง

3.5.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอด (Chago) ใน tissue culture flasks (T-flask) ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM) ที่มีซีรัม (Fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์และยาปฏิชีวนะ Penicillin - Streptomycin 0.01 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้ Incubator ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศา

เซลเชียสที่มีความชื้น และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน หรือเมื่อเซลล์มีจำนวนมากเกินไป

3.5.2 การแยกเซลล์จากภาชนะเลี้ยงเซลล์และเตรียมเซลล์เพื่อการทดลอง นำเซลล์มะเร็งในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเต็มพื้นผิวด้านในของขวดเลี้ยงเซลล์มาดูดอาหารเก่าออก ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังตกค้างอยู่ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Typsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 มิลลิลิตร หรือใช้ปริมาตรที่มากพอที่คลุมเซลล์ที่เกาะผิวได้อย่างทั่วถึง เมื่อเซลล์เริ่มหดตัว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-5 นาที ดูด Trypsin ทิ้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ประมาณ 3.5 มิลลิลิตร ใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง เพื่อให้เซลล์กระจายตัวเข้ากับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใส่เข้าไปใหม่ (resuspend) ถ้าต้องการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่อง (subculture) สามารถถ่ายเซลล์ไปยังภาชนะเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่โดยปรับให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่หากต้องการจะทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่อการต้านเซลล์มะเร็ง จะทำโดยการคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด โดยการนำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) มานับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นเซลล์หรือจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางเซลล์แขวนลอยให้ได้ความเข้มข้นและปริมาตรของเซลล์ตามต้องการแล้วจึงนำไปทดสอบต่อไป

3.5.3 การนับจำนวนเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้ hemacytometer นำเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ผ่านกระบวนการ Trypsinization แล้วมาหาความเข้มข้น (จำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยง 1 มิลลิลิตร) โดยนำเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยง 20 ไมโครลิตรผสมกับ Trypan blue 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เตรียมอุปกรณ์ hemacytometer โดยทำความสะอาดที่ตัวสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นกระจกวางบนบริเวณที่จะใช้นับเซลล์บนสไลด์ กดแผ่นกระจกปิดเบาๆ ใช้ปิเปตอัตโนมัติผสมเซลล์ที่ใส่ Trypan blue ให้กระจายตัวสม่ำเสมอและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวในอาหารเลี้ยงดูดเซลล์ในอาหารเลี้ยงมาใส่ในช่องระหว่างแผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ นำไปนับจำนวนเซลล์ในตารางตามที่กำหนดด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด phase contrast โดยนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสีย้อมของ Trypan blue เป็นสีฟ้า จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ หรือจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร เพื่อนำมาปรับความเข้มข้นของเซลล์ และปริมาตรที่เหมาะสมเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.5.4 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดต่อการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง โดยการตรวจความสามารถในการมีชีวิตรอดเซลล์มะเร็งโดย MTT assay นำเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงจากข้อที่ 3.5.2 ที่ได้ปรับให้มีความเข้มข้น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปรับปริมาตรที่เหมาะสมกับความต้องการใช้งาน โดยการทดลองทำในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 wells plate) แต่ละหลุมจะมีปริมาตรที่เหมาะสม 200 ไมโครลิตร ดังนั้นการทดลองที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 1 ถาด จะต้องการเซลล์แขวนลอยประมาณ 10 มิลลิลิตร ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แต่ละหลุมได้รับเซลล์แขวนลอย 100 ไมโครลิตร ดังนั้นในแต่ละหลุมจะมีเซลล์ประมาณ 5,000 เซลล์ นำถาดที่มีเซลล์ไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำถาดที่มีเซลล์มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆที่ได้คัดเลือกไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 100 ไมโครลิตร บ่มในสภาพเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเซลล์

ในถาดเลี้ยงเซลล์ไปตรวจสอบผลของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay โดยการเติมสาร MTT (3- [4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) PBS ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.4 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำถาดไปในบ่มตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตรอดจะสามารถเปลี่ยนสารละลาย MTT ซึ่งเป็น tetrazolium dye ที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan ที่เป็นผลึกสีน้ำเงินหรือสีม่วง ซึ่งความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจึงทำให้สามารถวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยเทคนิคทาง colorimetric method ได้ และเมื่อเปรียบเทียบสีกับเซลล์ในหลุมที่ไม่ได้รับสารสกัดก็สามารถนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดได้ โดยในขั้นตอนต่อไปดูดสารละลาย MTT ออกจากทุกหลุมแล้วเติม DMSO (dimethyl-sulfoxide) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำถาดเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทำการทดลองไว้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbancy) ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทันที โดยใช้หลุมที่ไม่ได้รับสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม นำค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละหลุมทดลองที่ได้รับสารสกัดมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม

3.6 <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50}</u>

ทำการทดลองตามข้อที่ 3.5 แต่ใช้สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} ในการบ่มกับเซลล์มะเร็งปอดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการศึกษา

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจาก พื้นที่ศึกษาวิจัย สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในปี พ.ศ. 2552 และ 2553

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดในบริเวณป่าในพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ในปี พ.ศ. 2553 รวม 5 ครั้ง สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 146 ตัวอย่าง ได้ให้รหัสตัวอย่างตามลำดับที่ขึ้นต้นด้วย KK ได้แก่ KK 01, KK 02..., KK 146 สามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ได้รวม 22 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2553

ครั้งที่	วันที่	จำนวนตัวอย่าง	ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ได้
1	17 ธ.ค. 2552	18	5 (KK 04, KK 07, KK14, KK16, KK1 8)
2	26 ก.พ. 2553	33	3 (KK 26, KK 28, KK 40)
3	10 เม.ย. 2553	26	8 (KK 54, KK 55, KK 60, KK 65, KK 66, KK 69, KK 70, KK 76)
4	20 มิ.ย. 2553	36	3 (KK 89, KK 98, KK 102)
5	10 ก.ค. 2553	29	3 (KK 122, KK 139, KK145)

ภาพที่ 1 ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 วันที่ 17 ธ.ค. 2552

ภาพที่ 2 ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 วันที่ 26 ก.พ. 2553

ภาพที่ 3 ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 วันที่ 10 เม.ย. 2553

ภาพที่ 4 ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 วันที่ 20 มิ.ย. 2553

ภาพที่ 5 ตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากการออกเก็บตัวอย่างครั้งที่ 5 วันที่ 10 ก.ค. 2553

2. การแยกเส้นใยบริสุทธิ์

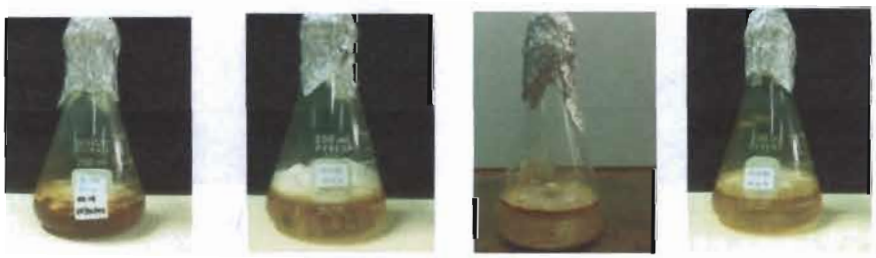
นำตัวอย่างเห็ดที่เก็บมาได้โดยคัดเลือกมา 8 ตัวอย่างคือ KK14, KK16, KK26, KK54, KK60, KK76, KK98 และ KK139 มาทำการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ประมาณ 3-5 วัน จะเห็นเส้นใยของเชื้อรานั้นเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ในแต่ละวันสังเกตว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นหรือไม่ ถ้ามีการปนเปื้อนควรย้ายชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดลงในอาหารใหม่ (subculture)

ภาพที่ 6 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14, KK16, KK26 และ KK54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA เป็นระยะเวลา 3-5 วัน

ภาพที่ 7 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK60, KK76, KK98 และ KK139 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA เป็นระยะเวลา 3-5 วัน

3. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเพื่อการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

นำตัวอย่างเห็ดที่ทำการแยกเส้นใยบริสุทธิ์ 8 ตัวอย่างคือ KK14, KK16, KK26, KK54, KK60, KK76, KK98 และ KK139 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) เส้นใยเห็ดในสภาพนิ่ง (stationary culture) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง รอให้เชื้อเจริญประมาณ 30-45 วัน นำมากรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร



KK14 KK16 KK26 KK54

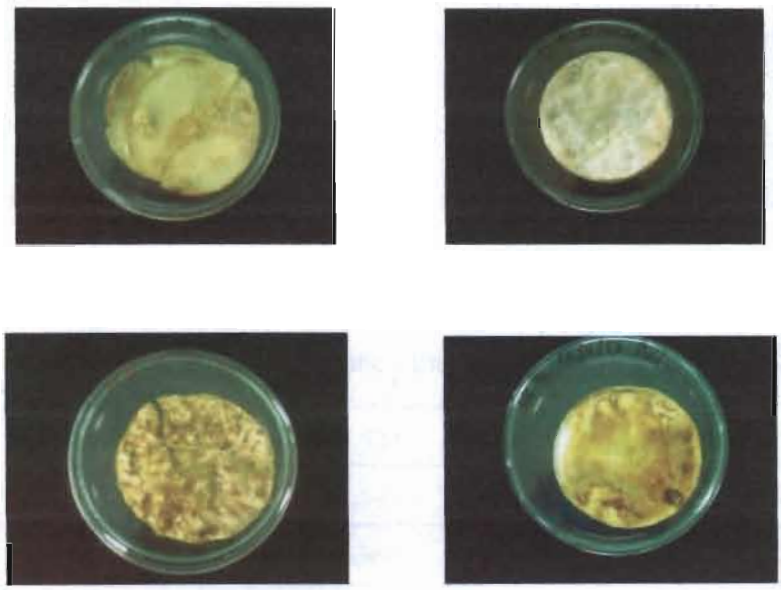
ภาพที่ 8 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14, KK16 , KK26และ KK54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

KK60 KK76 KK98 KK154

ภาพที่ 9 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK60, KK76, KK98 และ KK154 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDB

4. การอบแห้งตัวอย่างเห็ด

นำเส้นใยที่กรองและล้างแล้วมาอบแห้ง (drying) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 48 ชั่วโมง ถึง 1 สัปดาห์แล้วแต่ชนิดของเห็ด



ภาพที่ 10 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์ก่อนนำไปอบ

5. สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง

ทำการบดเส้นใยหรือดอกเห็ดที่อบแห้งแล้วด้วยเครื่องบด (blender) นำไปสกัดด้วยน้ำร้อน(ประมาณ 60 °C) ในอัตราส่วนเส้นใยหรือดอกเห็ด 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องซอกห์เลต (Soxhlet apparatus)

ภาพที่ 11 สารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง

6. ตรวจสอบปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี anthrone assay

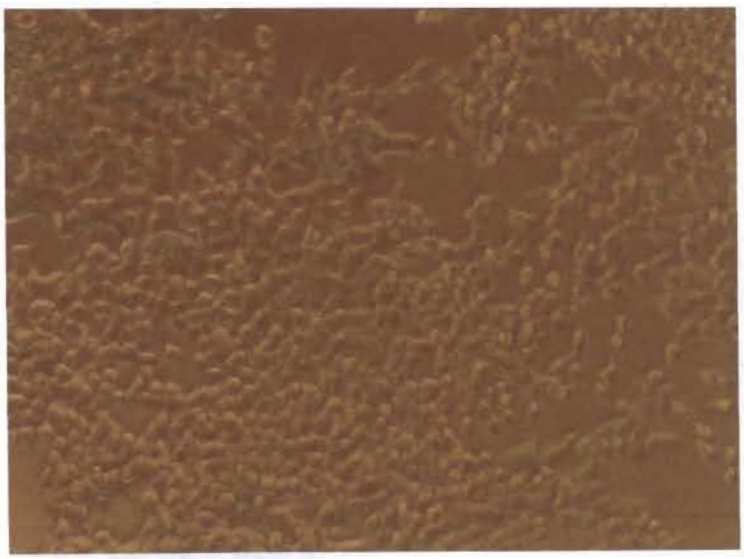
โดยการผสมสารสกัดจากเห็ดที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตรให้เข้ากันดีกับสารละลายอันโทรน 2.5 มิลลิลิตร สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที หากในสารสกัดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยความเข้มสีจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากเห็ด เมื่อนำสารสกัดจากทั้ง 8 ตัวอย่างคือ KK14, KK16, KK26, KK54, KK60, KK76, KK98 และ KK139 และจาก 1 ตัวอย่างที่สกัดจากดอกเห็ด คือ KK72 นำทดสอบหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone assay แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยตั้งแต่ 0.050–0.099 และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปทำการหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเทียบกับกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน พบว่าได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นสารสกัดพอลิแซกคาไรด์จากเห็ดที่เลือกมาเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง ได้แก่ KK14, KK16, KK54, KK60, KK 76, KK98 และ KK139

ตารางที่ 2 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 9 ตัวอย่าง

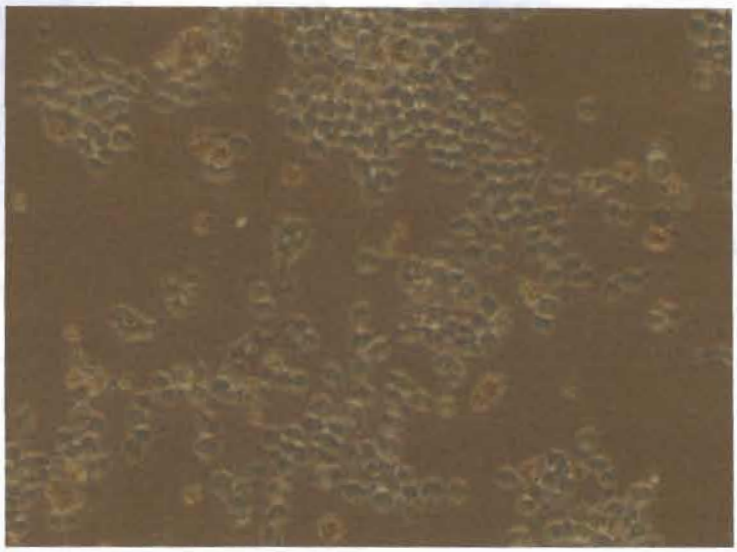
Sample	Polysaccharides concentration (mg/ml)	Polysaccharides concentration : 1 g dry weight (mg)
KK14	1.437	13.62
KK16	1.542	9.87
KK26	0.857	6.86
KK54	1.113	8.35
KK60	1.422	11.38
KK72	1.062	2.91
KK76	1.165	6.99
KK98	1.353	7.84
KK139	1.696	10.46

7. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง

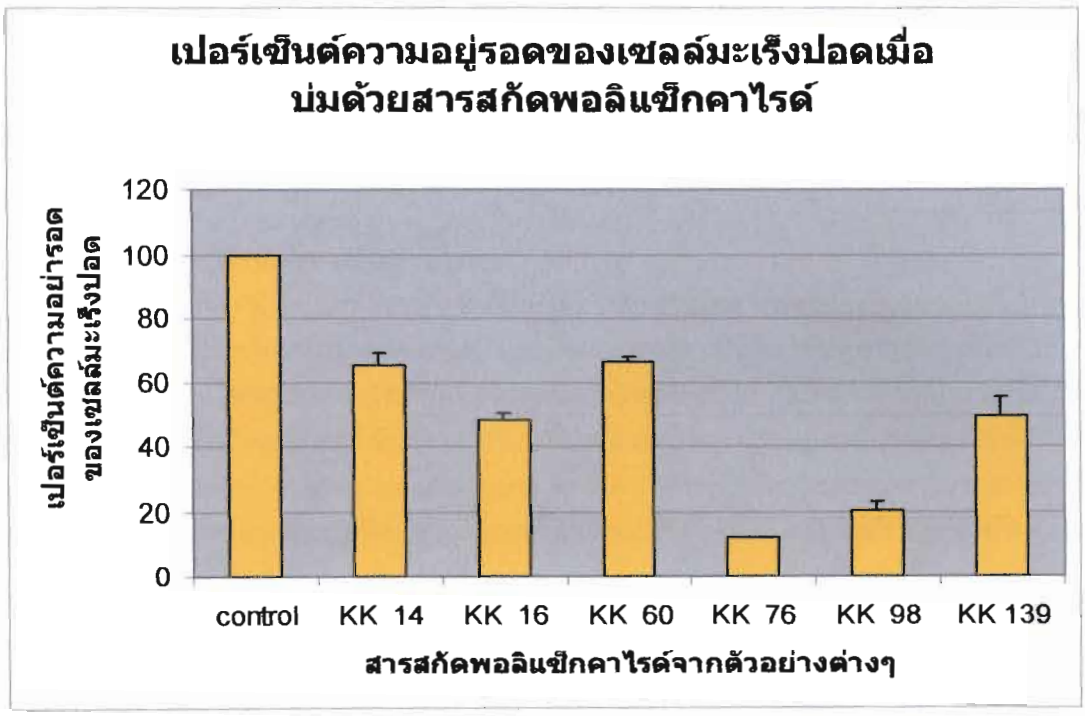
ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัม (fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์และยาปฏิชีวนะ Penicillin-Streptomycin 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่ปราศจากสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดโดยบ่มในตู้ Incubator ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์มะเร็งมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะผิว เซลล์บางยาวคล้ายกระสวยด้านบนและด้านล่างของเซลล์ไม่แตกต่างกัน (fibroblast like cell) (ภาพที่12) ใช้เวลาเพิ่มจำนวน 2-3 วัน จากนั้นนำเซลล์มะเร็งปอดมาทำการบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้คัดเลือกไว้จากข้อ 6 โดยใช้ความเข้มข้นดังนี้ 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ทำการหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดย MTT assay วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า KK 76 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดได้เท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 14) นอกจากนี้พบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีจำนวนน้อยลงเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัด (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 12 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



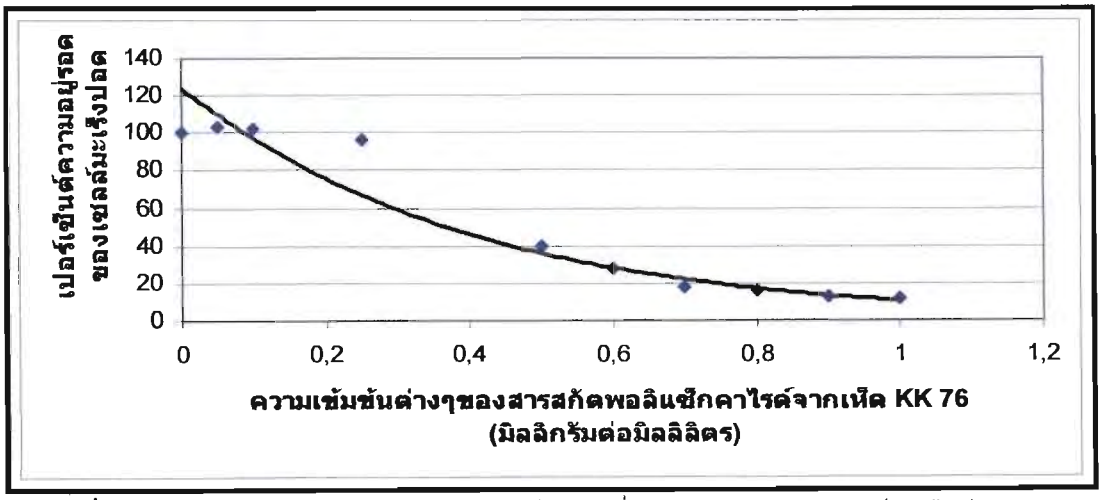
ภาพที่ 13 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างต่างๆ

8. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50}

นำเซลล์มะเร็งปอดมาทำการบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด KK 76 ที่ความเข้มข้นดังนี้ 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมพบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดอยู่ระหว่าง 27.80–11.89 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) โดยที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่าค่า IC_{50}



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง KK 76 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

9. การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างเห็ด KK 76 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของดอกเห็ดที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ลักษณะของหมวกดอก (cap) และสีของดอกเห็ด เป็นต้น หรือดูจากสัณฐานวิทยาภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากลักษณะสปอร์ ขนาดสปอร์ ลักษณะเส้นใย เป็นต้น จากนั้นนำมาเปรียบเทียบและตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์ พบว่า KK 76 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดนั้นเป็นเห็ดชนิด *Microporus xanthopus* (Fr.) Kunt (ภาพที่ 16) โดยใช้ข้อมูลและเอกสารจากหน่วยปฏิบัติงานวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช พบรายละเอียดลักษณะของ KK76 ตรงกับลักษณะทางสัณฐานของ *Microporus xanthopus* ดังนี้

ลักษณะดอก: ดอกยึดติดกับก้านที่สั้นตรงกลางดอก มีลักษณะเป็นช่อกรวยบุ๋มลงตรงกลาง บางดอกเชื่อมติดกับดอกอื่นคล้ายดอกเดียวกันที่มีหลายก้าน เส้นผ่าศูนย์กลางดอก 50-55 มิลลิเมตร ขอบดอกม้วนลงโค้งเป็นคลื่น

ผิวหมวกดอก: สีน้ำตาลอ่อน เรียบเงา มีลักษณะเป็นแถบโซนขนาดเล็กตามแนวรัศมีออกจากกึ่งกลางดอกแยกออกจากชั้นเนื้อดอกชัดเจน

ก้านดอก: สั้น 8-10 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 มิลลิเมตร ก้านกลมแคบเข้าตรงกลาง และกว้างออกบริเวณที่ยึดติดกับฐานสีขาวเหมือนกับผิวใต้ดอกและมีลักษณะเป็นยางสีน้ำตาลอ่อนหุ้ อยู่บริเวณก้าน

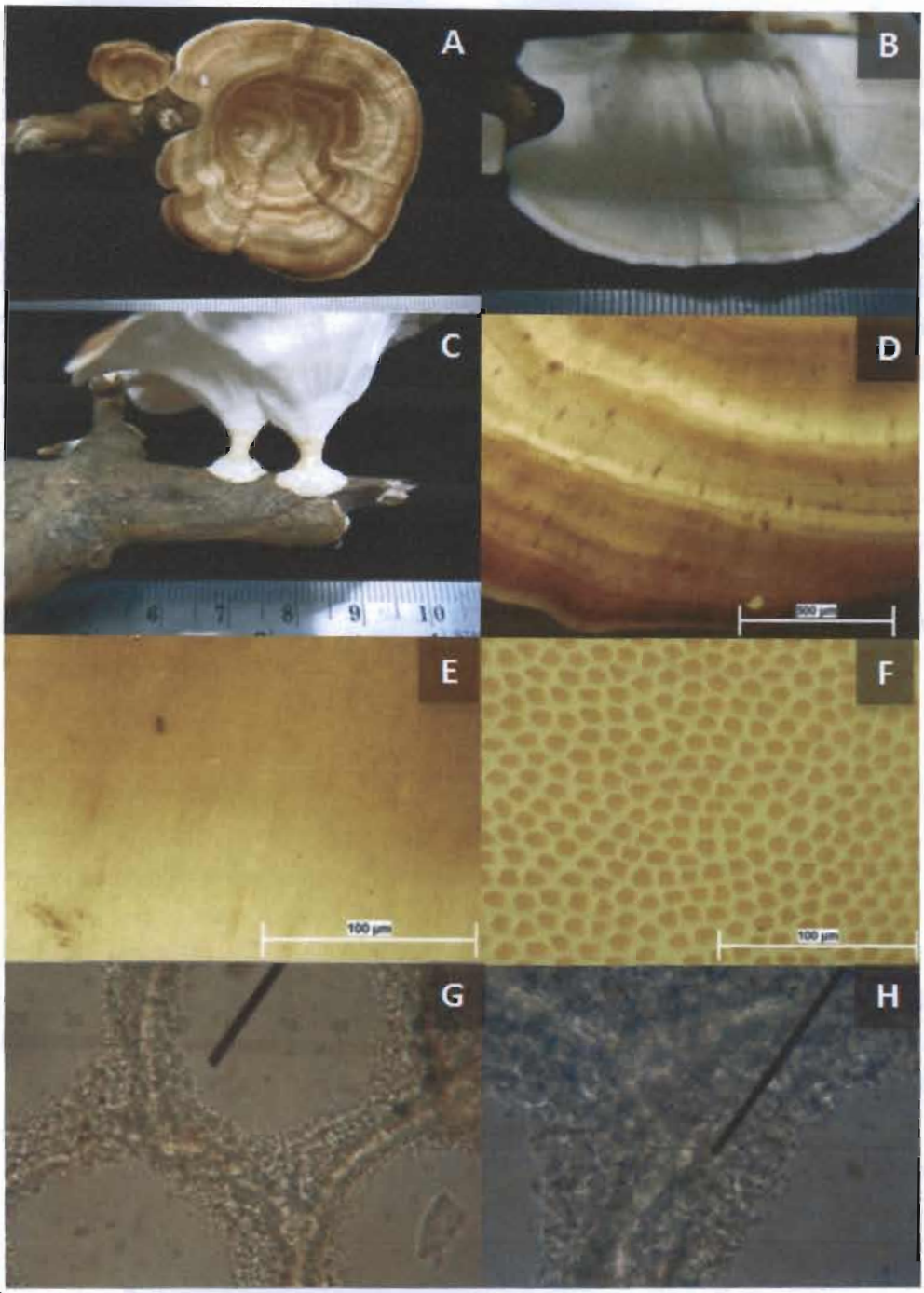
ผิวใต้ดอก: สีขาวครีม บริเวณขอบมีสีขาวซึ่งไม่มีรูดอกแยกออกชัดเจน รูใต้ดอกกลมถึงหลายเหลี่ยม ผนังบาง 8-9 รูต่อมิลลิเมตร

เนื้อดอก: สีขาวครีมตลอดทั้งดอกและก้าน แยกออกจากชั้นผิวหมวกดอกชัดเจน หนา 1-1.5 มิลลิเมตร เนื้อค่อนข้างเหนียว แต่สามารถฉีกหักได้

ลักษณะสปอร์: ขนาดเล็กมาก พบได้ยาก

ระบบเส้นใย: Trimitric

หมายเหตุ: ชื่อในภาษาไทยคือ “เห็ดกรวยทองตะกู” พบได้โดยทั่วไป พบเจริญบนซากไม้และสามารถเพาะเส้นใยบริสุทธิ์ได้



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Microporus xanthopus* (A-D) ลักษณะของดอก (D-E) ผิวหมวกดอก (6.3X, 40X) (F) ผิวใต้หมวกดอก (40x) (G-H) ลักษณะเส้นใยบริเวณผิวใต้หมวกดอก (400X, 1000X)

10. สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงปี พ.ศ. 2552 และ 2553โดยเก็บตัวอย่างเห็ดซึ่งเจริญอยู่บนซากพืชที่ตายแล้ว พื้นดินหรือมูลสัตว์ เมื่อนำมาแยกเส้นใยบริสุทธิ และคัดเลือกมา 8 ตัวอย่างคือ KK14, KK16, KK26, KK54, KK60, KK76, KK98 และ KK139 และจาก 1 ตัวอย่างที่สกัดจากดอกเห็ด คือ KK72 และทำการสกัดด้วยน้ำร้อนเนื่องจากสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโครงสร้างของเซลล์ที่พบมากในเห็ดและเป็นสารกลุ่มที่ละลายน้ำได้ (Mizuno, 1996) และเมื่อนำมาหาปริมาณความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ โดยทำการผสมสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่เจือจางแล้วให้เข้ากับสารละลายอันโทรนที่มีส่วนผสมระหว่างสารอันโทรนกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น พบว่าหากในสารสกัดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยความเข้มสีจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากเห็ด จากการทดลองพบว่า KK139 มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดคือ 1.696 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าใน 1 กรัมของเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งของตัวอย่างดังกล่าวให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 10.46 กรัม รองลงมาคือ KK16, KK14, KK60, KK98, KK54, KK76, KK72 และ KK26 ตามลำดับ โดยการสกัดออกมาให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงหรือต่ำนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น วิธีการที่ใช้ในการสกัด ระยะเวลาที่ใช้ชนิดของเห็ด รวมไปถึงอาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สำหรับสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างเห็ด KK76 นั้นมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งปอดได้เท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์มีจำนวนน้อยลงเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีสารสกัด สารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพรองรองลงมา คือ KK98, KK16, KK139, KK14 และ KK60 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดได้เท่ากับ 79, 52, 50, 35 และ 34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน เมื่อนำสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่าง KK76 ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาบ่มกับเซลล์มะเร็งปอดพบว่าสารสกัดดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดอยู่ระหว่าง 27.80–11.89 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความเข้มข้น 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50}

เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ด KK76 เช่น ลักษณะของหมวกดอก (cap) และสีของดอกเห็ด เป็นต้น หรือดูจากสัณฐานวิทยาภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากลักษณะสปอร์ ขนาดสปอร์ ลักษณะเส้นใย เป็นต้น เพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์ พบว่า KK76 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดนั้นเป็นเห็ดชนิด *Microporus xanthopus* (Fr.) Kunt หรือชื่อในภาษาไทยคือ “เห็ดกรวยทองตะกู” จัดอยู่ใน Order Polyporales และอยู่ใน Family Polyporaceae โดยใช้ข้อมูลเอกสารจากหน่วยปฏิบัติงานวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช พบว่า ลักษณะดอกเป็นดอกยืดติดกับก้านที่สั้นตรงกลางดอก มีลักษณะเป็นช่อกรวยบุ๋มลงตรงกลาง บางดอกเชื่อมติดกับดอกอื่นคล้ายดอกเดียวกันที่มีหลายก้านเส้นผ่านศูนย์กลางดอก 50-55 มิลลิเมตร ขอบดอกม้วนลงโค้งเป็นคลื่น ผิวหมวกดอกมีสีน้ำตาลอ่อน เรียบเงา มีลักษณะเป็นแถบโซนขนาดเล็กตามแนวรัศมีออกจากกึ่งกลางดอกแยกออกจากชั้นเนื้อดอกชัดเจน บริเวณก้านดอกสั้นมีขนาด 8-10 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 มิลลิเมตร ก้านกลมแคบเข้าตรงกลาง และกว้างออกบริเวณที่ยึดติดกับฐานสีขาวเหมือนกับผิวใต้ดอก และมีลักษณะเป็นยางสีน้ำตาลอ่อนหุ้มอยู่บริเวณก้าน ผิว

ใต้ดอกมีสีขาวครีม บริเวณขอบมีสีขาวซึ่งไม่มีรูดอกแยกออกชัดเจน รูใต้ดอกกลมถึงหลายเหลี่ยม ผนังบาง เนื้อดอกมีสีขาวครีมตลอดทั้งดอกและก้าน แยกออกจากชั้นผิวหมวกดอกชัดเจน หนา 1-1.5 มิลลิเมตร เนื้อค่อนข้างเหนียวแต่สามารถฉีกหักได้ โดยลักษณะสปอร์จะมีขนาดเล็กมากซึ่งพบได้ยากและมีระบบเส้นใยเป็นแบบ Trimitric ซึ่งเห็ดกรวยทองตะกูนี้สามารถพบได้โดยทั่วไป เจริญบนซากไม้และสามารถเพาะเส้นใยบริสุทธิ์ได้

11. การเก็บตัวอย่างเห็ดในปี พ.ศ. 2554

หลังจากเสร็จการวิจัยในห้องปฏิบัติการ ได้ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ดในบริเวณพื้นที่ป่าสำหรับการศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรีอีก 1 ครั้ง เมื่อวันที่ 25 มิ.ย. 2554 สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ได้ให้รหัสตัวอย่างตามลำดับที่ขึ้นต้นด้วย KK/54 ได้แก่ KK01/54, KK02/54..., KK19/4 ดังสรุปในตารางที่ 3 โดยมีรูปตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 17

ตารางที่ 3 การเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี วันที่ 25 มิ.ย. 2554

ครั้งที่	วันที่	จำนวนตัวอย่าง	ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ได้
1	25 มิ.ย.2554	19	2 (KK 14/54, KK 17/54)

KK 1/54 KK 2/54 KK 3/54 KK 4/54 KK 5/54

KK 6/54 KK 7/54 KK 8/54 KK 9/54 KK 10/54

KK 11/54 KK 12/54 KK 13/54 KK 14/54

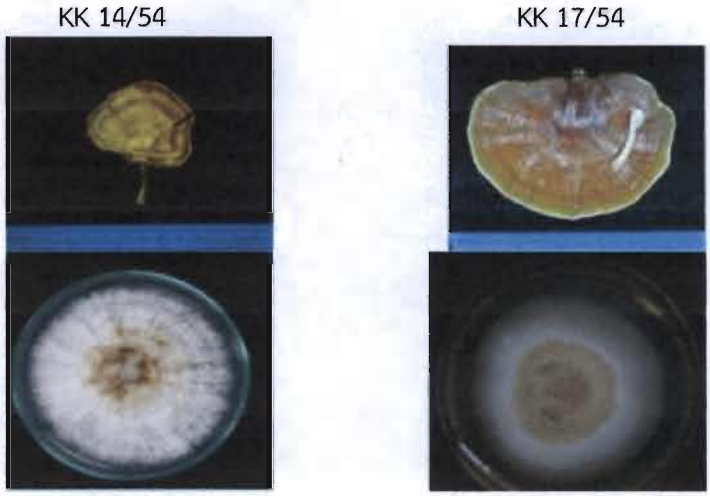
KK 15/54

KK 17/54 KK 18/54 KK 19/54

ภาพที่ 17 ตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการออกเก็บตัวอย่างเมื่อวันที่ 25 มิ.ย. 2554

12. การแยกเส้นใยบริสุทธิ์ของตัวอย่างเห็ดที่เก็บในปี 2554

นำตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้มาทำการแยกเส้นใยให้บริสุทธิ์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ประมาณ 3-5 วัน จะเห็นเส้นใยของเชื้อรานั้นเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ในแต่ละวันสังเกตว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นหรือไม่ ถ้ามีการปนเปื้อนควรย้ายชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดลงในอาหารใหม่ (subculture)



ภาพที่ 18 ลักษณะของเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างเห็ด KK14/54 และ KK17/54 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA

13. จัดจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดที่แยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้

ลักษณะของ KK 14/54 สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Microporus xanthopus* (Fr.) Kunt ซึ่งมีชื่อภาษาไทยว่า "เห็ดกรวยทองตะกู" (ภาพที่ 16)

ลักษณะของ KK 17/54 สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst ชื่อภาษาไทยคือ "เห็ดหลินจือ" (ภาพที่ 19) ซึ่งมีข้อมูลรายละเอียด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกดังนี้

ลักษณะของ KK17/54 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst (รูปที่ 19)

ลักษณะดอก: ยึดอยู่กับฐานโดยไม่มีก้านขนาด หรือมีก้านสีเดียวกันกับผิวหมวกดอกก้านอยู่บริเวณขอบด้านหนึ่งของดอกโดยดอกมีลักษณะเป็นรูปพัดค่อนข้างกลมแคบเข้า บริเวณฐาน หรือก้านกว้างถึง 80 มม. หนาถึง 15 มม.

ผิวหมวกดอก: สีน้ำตาลแดงเป็นมันเงา เนื้อแข็ง บริเวณขอบสีเหลืองขาว

ก้านดอก: เนื้อแข็ง สีเดียวกับผิวหมวกดอก ไม่มีลวดลาย เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 มม. ยาว 30-40 มม.

ผิวใต้ดอก: สีขาวครีม รูใต้ผิวดอกรูปร่างกลมถึงเหลี่ยม 4-6 รู/ มม. ท่อรูหนาสูงสุดถึง 10 มม.

เนื้อดอก: สีขาวครีมถึงน้ำตาลเข้ม เนื้อค่อนข้างเหนียว หนาถึง 3 มม. บริเวณใกล้ฐาน

ลักษณะสปอร์: ค่อนข้างกลมรี คอดเข้าด้านเดียว มีผนังหุ้ม 2 ชั้นชัดเจน ผนังด้านนอกค่อนข้างใสถึงน้ำตาล ผนังด้านในสีเข้มมีหนาม ขนาด 8-12 x 5-6 ไมโครเมตร

ระบบเส้นใย: Trimitric

หมายเหตุ: ชื่อในภาษาไทยคือ "เห็ดหลินจือ" ใช้เป็นยาบำรุง ลักษณะภายนอกค่อนข้าง หลากหลาย เช่น รูปร่างของรูใต้ดอกพบเจริญบนเนื้อไม้ และสามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้

ภาพที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Ganoderma lucidum* (A-C) ลักษณะของดอก (D-E) ลักษณะผิวใต้ดอก (40X) (F-G) สปอร์ (400X, 1000X)

การตรวจสอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของ KK14/54 และ KK17/54 ด้วยวิธีอันโทรนได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดจาก KK14/54 และ KK17/54

Sample	Polysaccharides concentration (mg/ml)	Polysaccharides concentration : 1 g dry weight (mg)
KK14/54	1.165	6.99
KK17/54	1.353	7.84

ตัวอย่างเห็ดอื่นๆจากการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้อยู่ในระหว่างการจัดจำแนก อย่างไรก็ดีตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ทั้งหมดในครั้งนี้สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ใน 2 คลาส (Basidiomycetes และ Ascomycetes) โดยมี 4 อันดับ (Agaricales, Polypolales, Boletales และ Perizales) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ในการเก็บตัวอย่างวันที่ 25 มิ.ย. 2554

กลุ่ม	ตัวอย่าง
1. Basidiomycetes(Agaricales)	KK 1/54, KK 2/54, KK 3/54, KK 4/54, KK 7/54, KK 9/54, KK 12/54, KK 13/54, KK 18/54, KK 19/54,
2. Basidiomycetes (Polypolales)	KK 5/54, KK 8/54, KK 11/54, KK 14/54, KK 15/54, KK 17/54
3. Basidiomycetes (Boletales)	KK 10/54
4. Ascomycetes (Perizales)	KK 6/54

สรุปและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

1. 1 จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในบริเวณป่าของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี 5 ครั้ง ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2553 สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 146 ตัวอย่าง และในช่วงปี 2554 1 ครั้ง สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 19 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่เก็บได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และสามารถที่จะนำไปทำการแยกเส้นใยบริสุทธิ์หรือทำการจัดจำแนกได้ แต่ก็มีบางตัวอย่างที่เกิดการเน่าเสียไป ไม่สามารถใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ เนื่องจากเป็นเห็ดชนิดที่มีปริมาณน้ำอยู่มาก จากจำนวนเห็ดที่พบและเก็บได้จากการสำรวจ 6 ครั้งนั้น ถือว่าได้ปริมาณเห็ดค่อนข้างมากและมีความหลากหลาย แม้การสำรวจในบางครั้งอยู่ในช่วงหน้าแล้ง โดยในช่วงหน้าแล้งนั้นจะพบเห็ดในกลุ่มเห็ดขอนและเห็ดกระด้างขึ้นอยู่ตามขอนไม้ เห็ดเหล่านี้จะต้องการน้ำปริมาณน้อยในการเจริญ จึงทำให้สามารถพบเห็ดเหล่านี้ได้ นอกจากนั้นแล้วการที่พบเห็ดในหลากหลายชนิด แม้การสำรวจไม่สามารถทำได้ครบทุกเดือนในรอบปีตามที่ตั้งใจไว้ เป็นตัวบ่งชี้หนึ่งว่าพื้นที่ป่าสำหรับการศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวเขาเขียว เป็นพื้นที่ป่าที่ยังมีความอุดมสมบูรณ์อยู่

1.2 จากจำนวนตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ทั้งหมด 165 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกได้เป็น 9 สายพันธุ์ (อ้างถึง รายงานผลการดำเนินงาน ปีงบประมาณ 2553) สามารถแยกเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ได้ 24 ตัวอย่าง การที่แยกเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดได้น้อยนั้นมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ ได้แก่

- ดอกเห็ดมีความไม่สมบูรณ์ เกิดการเน่าเสีย
- ดอกเห็ดมีการปนเปื้อนจากราหรือแบคทีเรียชนิดต่างๆ
- เห็ดหลายชนิดที่เก็บได้จัดเป็นกลุ่ม Ectomycorrhiza ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเห็ดกลุ่มนี้จะไม่สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ อย่างไรก็ตามการที่แยกเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ได้ จะช่วยทำให้การวิจัยในขั้นต่อไปทำง่ายขึ้น เนื่องจากสามารถเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยให้ได้ในปริมาณที่ต้องการให้ห้องปฏิบัติการได้

1.3 เห็ดที่เก็บได้สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม Polypore กลุ่ม Resupinate กลุ่ม Agarics กลุ่ม Coral Fungi กลุ่ม Puffball กลุ่ม Cup fungi และกลุ่ม Jelly fungi ซึ่งกลุ่มเห็ดเหล่านี้มีรายงานพบในประเทศไทย (อ้างถึง รายงานผลการดำเนินงาน ปีงบประมาณ 2553)

1.4 จากตัวอย่างเห็ด 146 ตัวอย่างจากการเก็บตัวอย่างในปี 2552-2553 สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างเห็ดได้ 26 ตัวอย่าง โดยสามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุล 1 ตัวอย่างและระดับสายพันธุ์ 25 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างเห็ดที่ทำการสำรวจ 1 ครั้งในปี พ.ศ. 2554 พบว่าส่วนใหญ่เป็นเห็ดในลำดับ Basidiomycetes ซึ่งมี 3กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม Polypore 6 ตัวอย่าง กลุ่ม Agarics 10 ตัวอย่าง กลุ่มเห็ดตับเต่า (Boletus) 1 ตัวอย่าง และ พบเห็ดในลำดับ Ascomycetes 1 ตัวอย่าง เห็ดที่พบในการสำรวจส่วนใหญ่ที่สามารถจัดจำแนกได้อยู่ในกลุ่ม Polypore เมื่อเปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยเกี่ยวกับเห็ดในประเทศไทย พบว่าเห็ดที่สามารถจัดจำแนกในการวิจัยนี้ได้มีรายงานการพบว่ามีอยู่แล้วในประเทศไทย อย่างไรก็ตามเห็ดหลายสายพันธุ์มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นเห็ดที่พบในเขตร้อนและยังไม่มีรายงานการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงเทคโนโลยีชีวภาพแต่อย่างใด

2. การนำเห็ดที่พบมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การนำเห็ดตัวอย่างจากการเก็บตัวอย่างปี พ.ศ. 2552-2553 จำนวน 146 ตัวอย่างมาแยกเส้นใยบริสุทธิ์ สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 22 ตัวอย่าง เลือกมา 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากดอกเห็ดอีก 1 ตัวอย่าง มาทำการขยายเส้นใยและสกัดพอลิแซคคาร์ไรด์โดยใช้น้ำร้อน นำสารสกัดพอลิแซคคาร์ไรด์มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดพบว่ามีสารสกัดพอลิแซคคาร์ไรด์จากเห็ด 1 ตัวอย่างที่มี

ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งปอด (Chago) ได้ดี สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดได้ถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำตัวอย่างดอกเห็ดไปทำการจัดจำแนกพบว่าเป็นเห็ดที่มีชื่อภาษาไทยว่า "เห็ดกรวยทองตะกู" และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Microporus xanthopus* (Fr.) Kunt ส่วนตัวอย่างจากการเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2554 จากตัวอย่างเห็ดทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง สามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ได้ 2 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างดอกเห็ดดังกล่าวไปทำการจัดจำแนกพบว่า 1 ตัวอย่างเป็นเห็ดกรวยทองตะกู เช่นเดียวกับที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพอลิแซคคาร์ไรด์ต่อการต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งไปแล้ว และอีก 1 ตัวอย่างพบว่าเป็นเห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการนำไปใช้ประโยชน์ค่อนข้างมากอยู่แล้ว

ข้อเสนอแนะ

1. **การศึกษาทางด้านความหลากหลายของเห็ด**

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างเห็ด จากพื้นที่ป่าเพื่อการศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวรวม 6 ครั้ง ในช่วง 2 ปีงบประมาณ (ปีงบประมาณ 2553 และ 2554) สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดได้รวม 165 ตัวอย่าง สะท้อนถึงความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความหลากหลายของเห็ดในพื้นที่นี้ชัดเจน ควรสนับสนุนให้มีการเก็บตัวอย่างทุกเดือน และใช้พื้นที่ตัวอย่างบริเวณอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ มีการเก็บตัวอย่างซ้ำในพื้นที่เดิม 1 ครั้ง อย่างไรก็ดีแม้จะเก็บตัวอย่างซ้ำในพื้นที่ แต่การเก็บต่างช่วงเวลากันก็สามารถพบตัวอย่างที่แตกต่างไปจากที่เคยเก็บมาก่อน ปัญหาที่พบในการเก็บตัวอย่างเห็ดจากการวิจัยครั้งนี้ เกิดกับเห็ดที่ปริมาณน้ำในดอกสูงทำให้เกิดการสูญเสียตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาต่อ อาจจะต้องหาทางแก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนวิธีการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ในกรณีที่เป็นเห็ดที่อุ้มน้ำ โดยอาจจะต้องนำภาชนะที่บรรจุเจลดูดความชื้นเข้าไปในพื้นที่ด้วย นอกจากนั้นอาจจะต้องปรับเปลี่ยนวิธีการดำเนินการกับตัวอย่างที่เก็บได้ เนื่องจากในการศึกษาที่ผ่านมาจะใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ศึกษาประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วรีบเดินทางกลับมาดำเนินการต่อในห้องปฏิบัติการ อาจจะต้องเปลี่ยนเป็นการจัดการกับตัวอย่างให้เหมาะสมก่อนเดินทางกลับ เพื่อรักษาสภาพของตัวอย่าง

ปัญหาอีกประการในการศึกษาครั้งนี้ คือขาดผู้ช่วยที่มีความรู้ความสามารถเกี่ยวกับเห็ดมากพอ เนื่องจากหลังจากเก็บตัวอย่างเห็ดมาได้จะต้องรีบมาดำเนินการหลายประการ ได้แก่ การจัดการเก็บและเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสำหรับการนำไปจัดจำแนก การเพาะเลี้ยงเส้นใยให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ การขยายปริมาณของเส้นใย การสกัดสารจากเส้นใยหรือดอกเห็ด ซึ่งแต่ละขั้นตอนต้องการผู้ทำการศึกษาที่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับเทคนิคที่ต้องใช้ในแต่ละขั้นตอนเป็นอย่างดี ซึ่งในช่วงที่ทำการศึกษาขาดแคลนผู้ช่วยในส่วนนี้เนื่องจากงานดังกล่าวต้องทำต่อเนื่องเป็นเวลานาน จึงขอเสนอให้มีการสนับสนุนผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของเห็ดในประเทศไทย เนื่องจากผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับเห็ดในประเทศไทยยังมีจำนวนน้อย ผู้ที่เชี่ยวชาญที่มีอยู่ได้เกษียรอายุราชการแล้ว หากสามารถผลิตผู้มีความเชี่ยวชาญได้มากขึ้นจะช่วยทำให้สามารถศึกษาความหลากหลายของเห็ดในพื้นที่ต่างๆได้มากขึ้น และสามารถนำเห็ดมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นด้วย

2. **การนำเห็ดที่พบมาใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ**

ในการศึกษาครั้งนี้เน้นการสกัดสารพอลิแซคคาร์ไรด์จากเห็ด มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดที่สามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์จากตัวอย่างต่างๆ ต่อการต้านเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำเห็ดไปใช้ประโยชน์ต่อไป นอกจากสารพอลิแซคคาร์ไรด์แล้วเห็ดยังมีสารอื่นๆที่น่าสนใจทำการศึกษาเพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ เช่น เอนไซม์ต่างๆ

และ เลคติน เป็นต้น จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากเห็ดอื่นๆเพิ่มเติม สำหรับการศึกษาเชิงวิชาการในระดับลึกอาจจะสามารถศึกษาถึงกลไกที่สารสกัดพอลิแซคคาร์ไรด์จากเห็ดสามารถต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ว่า สารสกัดดังกล่าวไปมีผลต่อกระบวนการหรือโมเลกุลใด

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 3. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2550.

ปริญญา รัตนะพิมาน. การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.]. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

วินัย กลิ่นหอม และอุษา กลิ่นหอม. 57 เห็ดเป็นยาแห่งป่าอีสาน. กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิสุขภาพไทย, 2548.

วิศรุต กิจพิพิธ การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552

อนงค์ จันทร์ศรีกุล ธานี พานิชผล, ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ และ อนิวรรต เฉลิมพงษ์. เห็ดในประเทศไทย. จำนวน 2,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: ทีฟิล์ม, 2550.

อรวรรณ สัตยาลัย สีหนาท ประสงค์สุข หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ รัชนีกร ธรรมโชติ และ กัมปนาท มหิพันธ์. รายงานผลการดำเนินงาน ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2553. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในพื้นที่ศึกษาวิจัยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี และการคัดเลือกเห็ดที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์, 2553

Chandrasrikul, A., Suwanarit, P., Sangwanit, U., Morinaga, T., Nishizawa, Y., and Murakami, Y. Diversity of Mushrooms Macrofungi in Thailand. Bangkok: Kasetsart University, 2008.

Chang, W., Lee, S., Kim, J., Park, Y. and Hwang, B. Effect of mycelia culture broth of *Ganodermar lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. Journal of Bioscience and Bioengineering 9 (2001)2: 550-555

Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., Dewitt, L.D., and G. Nair, M. Health-beneficial qualities of edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. Food Chemistry 108 (2007): 97-102.

Daba, A. and Ezeronye, O. Antitumor effect of polysaccharide isolated from higher basdiomycetes mushroom . African Journal of Biotechnology 2 (2003): 672-678.

El-Gohary, A. Chaos and optimal control of cancer self-remission and tumor system steady states. Chaos, Solitons and Fractals 37 (2008): 1305-1316.

Gibbs, W. Untangling the root of cancer. Scientific American 289 (2003): 48-57

Hobbs, C. Medicinal Mushrooms. Oregon: Botanica Press, 1986

Ikekawa, T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. International Journal of Medicinal Mushrooms 3 (2001): 291-298.

Kamiyama, Y. Improving effect of active hexose correlated compound (AHCC) on the prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients. European Surgical Research 31(1992): 261.

Leal-Serrano, G., Ruperz, P., Leal, JA. 1980. Acidic polysaccharide form *Aureobasidium pullulans*. Transactions of the British Mycological Society 75 (1980): 57-62

Maeda, Y. and Chihara, G. A new immunoaccelerator of cell-mediated response. Nature 299(1971): 634-647.

Mizuno, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods and Food Ingredients Journal of Japan 167 (1996): 69-85.

Mizuno, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1 (1999): 9-29.

Moradali, M., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) (Review). International Immunophamacology 7 (2007): 701-724.

Nanba, H. Results of non-controlled clinical study for various cancer patients using Maitake D-fraction. Explore 6 (1995): 19-21.

Nie, X., Shi, B., Ding, Y. and Tao, W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and it potential biological activities. International Journal of Biological Macromolecules 39 (2006): 228-233.

Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hatori, T., Itoh, T. and Osawan, N. End point results of phase III study of lentinan. Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy 12 (1985): 366-380.

Wasser, J. and Sietaman, J. Wall structure and growth in *Schizophyllum commune*. Fungal Wall and Hypha Growth (1979): 27-37.

Wasser, S.P. and Weis, A.L. Medicinal Properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes Mushroom: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1 (1999): 31-62.

Wasser, S. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and biotechnology 10(2002): 13-32.

Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K. and Kawade, M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 41 (1994): 724-730.

ประวัติคณะวิจัย

ผศ. ดร. อรวรรณ สัตยาลัย

(ภาษาไทย) น.ส. อรวรรณ สัตยาลัย **ตำแหน่งทางวิชาการ** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Orawan Satayalai

ภาควิชา ชีววิทยา **คณะ** วิทยาศาสตร์ **โทรศัพท์** 02-2185381-3

ที่อยู่ปัจจุบัน 174 ซอยรามคำแหง 24 แยก 30 หมู่บ้านศิขริน ถนนรามคำแหง แขวง หัวหมาก เขต บางกะปิ กรุงเทพฯ 10240 โทรศัพท์ 02-3005017 และ 02- 7191791

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีววิทยา	2514
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สัตววิทยา	2517
Free University, Brussels, Belgium	Master of Science	Molecular Biology	2529
มหาวิทยาลัยมหิดล	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต	ชีววิทยา	2538

ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ (ระบุแหล่งพิมพ์และปีที่พิมพ์)

Research Papers (National)

1. Boonprakorb, P., Siripoon, P., and Satayalai, O., 1983. Effects of Salinity on Hatching Period and Development of Cuttlefish *Sepiella inermis*. Journal of Scientific Research, Chulalongkorn University 8 : 200-203.
2. Boonprakorb, P., Siripoon, P., and Satayalai, O., 1983. Mating Behavior of Cuttlefish *Sepiella inermis*. Thai Fisheries Gazettes 36(5) : 479 – 484.
3. Boonprakorb, P., Siripoon, P., Satayalai, O., and Sithigorngul, P., 1984. Effect of Salinity and Photoperiod on the Survival of Rock Barnacle *Balanus ampritite*. Journal of Scientific Research, Chulalongkorn University 9 : 74 - 78.
4. Boonprakorb, P., Siripoon, P., and Satayalai,O., 1984. Growth and Development of Cuttlefish *Sepeiella inermis*. Thai Science Journal, The Science Society of Thailand.36(5) : 479 – 484.
5. Satayalai, O., and Boonprakorb, P., 1980. The Relationship between Stripline on the Cuttlebone and age of the Cuttlefish *Sepiella inermis*. Thai Science Journal, The Science Society of Thailand. 34(3) : 276 – 281.

Research Papers (International)

1. Horejsi, V., Hilgert, I., Kistofova. J., and Satayalai, O., 1984. Murine Hybridoma Monoclonal Antibodies Against Insulin: Cross Reactivity with Insulin in Three Species and Blocking of Insulin Binding Receptor. Immunology Letters 8 : 279-283.

Proceedings (Abstract only)

1. Satayalai, O and D' Souza, J. 1981. Biochemical study of cellulase from *Penicillium funiculosum.* Federal of European Microbiology Society Symposium on Overproduction of Microbial Products 9-14 August 1981, Hradec Kralove, Czechoslovakia p.103
2. อรวรรณ สัตยาลัย 2530 นาฬิกาชีวภาพที่ควบคุมการเกิดบลาสโทซิสต์ของหนู (mice) การประชุมทางวิทยาศาสาตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 13 วันที่20 -23 ตุลาคม 2530 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หน้า 424-425.
3. Satayalai, O., Ngamsom, D. and Jareonpornipat, A. 2000. The Determination of Vitellogensis Site in Mud Crab *Scylla serata* by Immunocytochemical Techniques using Monoclonal Antibodies against Vitelline and Vitellogenin. The Fourth Congress of The Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinolgy., May 14-18, 2000. Academia Sinica, Taipei,Taiwan, Replubic of China.
4. Ngamsom, D., Satayalai, O., Sithigorngul, P. and Sithigorngul, W. 2000. Monoclonal Antibodies Production Specific to Vitelline and Vitellogenin of Mud Crab *Scylla serrata.* The Fourth Congress of The Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinolgy., May 14-18, 2000. Academia Sinica, Taipei,Taiwan, Replubic of China
5. Intarapat, A., Sailasuta, A., and Satayalai, O., 2004. Localization of primordial germ cells and gonadal development of Japanese quail *Corturnix japonica* embryo. 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-20 October 2004. p.45

6 Intarapat, S., Sailasuta, A., and Satayalai, O. 2004. Alteration of reproductive organ in Japanese quail *Corturnix japonica* embryo following *in ovo* exposure to genistein. The 9th Biological Science Graduate Congress., 16-18 December 2004 Chulalongkorn University, Bangkok, p. 56