รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาและการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้สูงอายุจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Bioactive Ingredients Extraction and Food Product Development for Elderly from *Cordyceps militaris*

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ : การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองให้มีสารออกฤทธิ์ทางยาสูงและมีประสิทธิภาพในการป้องกัน และ/หรือ บำบัดรักษาโรคในเชิงพาณิชย์

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2562
จำนวน 437,300 บาท

หัวหน้าโครงการ นางวิจิตรา แดงปรก
ผู้ร่วมโครงการ นายมงคล ถิรบุญยานนท์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
กันยายน 2563

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	4
คำนำ	5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการวิจัย	21
ผลการวิจัย	27
วิจารณ์ผลการวิจัย	32
สรุปผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในส่วนต่างๆ ของเห็ดถั่งเช่าสีทองและเห็ดถั่งเช่าทิเบต	8
ตารางที่ 2	ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	10
ตารางที่ 3	ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	11
ตารางที่ 4	ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ ที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน	15
ตารางที่ 5	ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	27
ตารางที่ 6	ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	28
ตารางที่ 7	IC_{50} ของ DPPH และ $ABTS^{\bullet+}$ของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	29
ตารางที่ 8	IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	29
ตารางที่ 9	IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	30
ตารางที่ 10	ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	30

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดถั่งเช่าทิเบต 11

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาและการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้สูงอายุจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Bioactive ingredients extraction and food product development for elderly from *Cordyceps militaris*

วิจิตรา แดงปรก[1]และมงคล ธิรบุญยานนท์[2]

Wichittra Daengprok and Mongkol Thirabunyanon

[1]คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเห็ดทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง ช่วยในการทำให้ร่างกายแข็งแรงและมีอายุยืนยาว ซึ่งปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจำนวน 6 สภาวะดังนี้ T1 = แสงสีขาว (หลอดยาว) T2 = แสงสีขาว (หลอดกลม) T3 = แสงสีน้ำเงิน T4 = แสงสีชมพู T5 = แสงสีแดง และ T6 = แสงสีผสม ต่อการสร้างคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ผลการวิจัยพบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่าง T2 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (หลอดกลม) มีปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 711.81±14.95 และ 41.79±6.99 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นได้นำเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่าง T2 ไปสกัดพอลิแซคคาไรด์ด้วยน้ำร้อนที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ได้สารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ผ่านการสกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด ตัวอย่างที่ 2 เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ผ่านการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด ตัวอย่างที่ 3 เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด และตัวอย่างที่ 4 เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดไขมันออกและใช้

อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่าตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างมีร้อยละของผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 41.02 – 41.79 ส่วนความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัสและค่าความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่ามีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) โดยพบว่าการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาทำการสกัดไขมันออกก่อนสกัดและการใช้อัลตราซาวน์ช่วยในระหว่างการสกัดสามารถทำให้สารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ดีขึ้น งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นว่าการสกัดไขมันร่วมกับการใช้อัลตราซาวด์เป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดได้

คำสำคัญ: สารออกฤทธิ์ทางยา เห็ดถั่งเช่าสีทอง อัลตราซาวด์ พอลิแซคคาไรด์

Abstract

Cordyceps militaris is a medical mushroom and exerts body health and longevity. It can be cultivated in laboratory under suitable condition now. This research investigated the effect of 6 light types including T1 = white light (long bulb), T2 = white light (round bulb), T3 = blue light, T4 = pink light, T5 = red light and T6 = mixed colour light on cordycepin and adenosine production of *C. militaris* mushroom. It was found that the T2 [white light (round bulb)] cultured *C. militaris* mushroom sample had the highest cordycepin and adenosine contents with the values of 711.81 $\pm$ 14.95 and 41.79 $\pm$ 6.99 mg/100 g, respectively. Subsequently, the T2 cultured *C. militaris* mushroom sample was extracted with hot water for 60 min at the temperature of 60 $^{\circ}$C to gain crude extracts of polysaccharides. The four samples of crude polysaccharide extracts were obtained as follows: - sample 1 was not defatted and not ultrasonicated, sample 2 was not defatted and ultrasonicated, sample 3 was defatted and not ultrasonicated, and sample 4 was defatted and ultrasonicated. It was found that the %yield of the 4 crude extracts samples was not significantly different ($p > 0.05$), which were in the ranges of 41.02 - 41.79%. The antioxidant properties including DPPH radical scavenging assay, improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay,

hydroxyl radical scavenging assay, ferrous chelating and ferric reducing power were found to be different ($p \leq 0.05$). It was found that the *C. militaris* mushroom crude polysaccharide extracts from defatted and ultrasonicated preparation had the better antioxidant properties antioxidant properties compared with those without defatted and sonicated preparation. This research is the first revealed that the defatting of raw material in combination with ultrasonication could improve antioxidant capacity of the extracts.

Key words: bioactive ingredients, *Cordyceps militaris*, ultrasound, polysaccharides

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาและการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้สูงอายุจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 ซึ่งผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตรและคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ ช่วยให้งานวิจัยนี้สามารถดำเนินการได้และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วิจิตรา แดงปรกและมงคล ถิรบุญยานนท์

ผู้วิจัย

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นฟังไจที่เจริญบนหนอนแมลง อยู่ในไฟลัม *Ascomycotina* คลาส *Clavicipitaceae* มีการใช้เป็นอาหารฟังก์ชันและยาเป็นเวลานานหลายปีมาแล้วในประเทศจีนและประเทศอื่นทางเอเชียตะวันออก (Ying *et al.*, 1987) มีการเพาะเลี้ยงทั่วไปในจีนและประเทศแถบเอเชียอื่นๆ เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสรรพคุณทางยามากมาย ได้แก่ ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็งและเนื้องอก ต้านออกซิเดชันและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น (Park *et al.,* 2009; Das *et al*., 2010; Jo *et al.,* 2010; Wu *et al*., 2010; Fu *et al*., 2013; Huang *et al*., 2013; Sun *et al*., 2014; Tuli *et al*., 2014; Yang *et al.,* 2015; Liu *et al*., 2016; Chen *et al*., 2017; Lin *et al.,* 2017; Luo *et al.,* 2017) โดยในเห็ดถั่งเช่าสีทองประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางยาหลายชนิด ได้แก่ คอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน คอร์ดีมินและพอลิแซคคาไรด์ เป็นต้น โดยสารประกอบคอร์ไดเซปิน (3'-ดีออกซีอะดีโนซีน) เป็นสารอนุพันธ์นิวคลีโอไซด์ ที่มีโครงสร้างคล้ายอะดีโนซีน แต่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางยามากกว่าอะดีโนซีน (Tuli *et al*., 2014) นิยมใช้เป็นสารที่บ่งบอกและบ่งชี้สารออกฤทธิ์ทางยาในถั่งเช่าชนิดต่างๆ รวมทั้งถั่งเช่าสีทอง

รูปแบบของถั่งเช่าสีทองที่มีจำหน่ายมีแบบที่เอาถั่งเช่าสีทองมาบดแล้วบรรจุแคปซูลและแบบที่เป็นสารสกัด ซึ่งในรูปแบบสารสกัดจะดีกว่า โดยมีสารออกฤทธิ์ทางยาที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากกว่า ซึ่งการพัฒนาสารสกัดซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาหรือทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติในปัจจุบันเป็นสิ่งที่ได้รับความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากการใช้ยาซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ในการรักษาโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวานและโรคมะเร็ง เป็นต้น มักทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร ความดันโลหิตต่ำผิดปกติและท้องผูก เป็นต้น ดังนั้นการรับประทานในรูปของสารสกัดจากธรรมชาติในการป้องกันและบรรเทาอาการของโรคจะดีต่อร่างกายมากกว่า ในงานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาในถั่งเช่าสีทองและการตรวจสอบสมบัติในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมและการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้สูงอายุ ข้อมูลที่ได้จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับเห็ดถั่งเช่าสีทอง มีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองอย่างกว้างขวางยิ่งขึ้น ซึ่งจะส่งผลดีต่อเกษตรกรอย่างยั่งยืนอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางยาในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ การสกัดไขมันออกและการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

2.เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัสและค่าความสามารถในการรีดิวซ์

3.เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้สูงอายุจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผู้ที่สนใจจะทำสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง เช่น กลุ่มเกษตรกร โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรที่ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง หรือกลุ่มผู้ประกอบการ SMEs ต่างๆ
2. นักวิจัย อาจารย์และนักวิชาการทั้งในภาครัฐและเอกชนที่สนใจงานวิจัยทางด้านอาหารที่สามารถออกฤทธิ์ทางยาและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ

การตรวจเอกสาร

เห็ด เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำจำพวกเชื้อราหรือฟังไจ (fungi) เห็ดที่บริโภคได้นอกจากเป็นอาหารเป็นแหล่งของสารอาหารแล้ว ยังมีบางชนิดที่ใช้เป็นสมุนไพร ซึ่งหมายความว่าเป็นเห็ดที่มีสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ทางยาในการป้องกันและรักษาโรคด้วยนอกเหนือจากการเป็นสารอาหาร ตัวอย่างเห็ดสมุนไพรดังกล่าว เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ เห็ดไมตาเกะ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมและเห็ดถั่งเช่า เป็นต้น ดังนั้นเห็ดจึงจัดเป็นอาหารฟังก์ชั่น (functional food) ชนิดหนึ่ง โดยชนิดของสารออกฤทธิ์ทางยาที่พบมีมากมายหลายชนิด ได้แก่ คอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน โปรตีน พอลิแซคคาไรด์ อัลคาลอยด์ พอลิฟีนอล กรดไขมัน แร่ธาตุและวิตามิน เป็นต้น

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps* spp.) มีหลายชนิด แต่ชนิดที่เป็นที่รู้จักกันดีมีด้วยกัน 2 ชนิดคือเห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) และเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เห็ดถั่งเช่าทิเบตเป็นเห็ดธรรมชาติที่พบได้ในบริเวณเทือกเขาสูงแถบทิเบต มักเจริญบนตัวหนอน เป็นเห็ดที่มีราคาสูงมาก ปัจจุบันเห็ดถั่งเช่าทิเบตตามธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลงมาก นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงยังทำได้ค่อนข้างยากอีกด้วย (Huang *et al.,* 2009)

การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองจะเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต โดยอาจเพาะเลี้ยงในอาหารที่เป็นแมลง เช่น ดักแด้ไหม เป็นต้น (Hong *et al.,* 2010; Luerdara *et al.,* 2015) ในอาหารเทียมอีกหลาย ๆ ชนิด เช่น ข้าว ถั่ว ข้าวโพด ข้าวสาลี ซูโครสและนม เป็นต้น (Lim *et al.,* 2012; Ritdate *et al.,* 2015; Singpoonga *et al.,* 2016) ทำให้การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองได้รับความสนใจศึกษาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางยาในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยง พบว่าสรรพคุณทางยาเทียบเท่ากับเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Das *et al.,* 2010, Hong *et al.,* 2010) นอกจากนี้ยังมีบางงานทดลองที่พบว่าสารสำคัญพวกคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีมากกว่าในเห็ดถั่งเช่าทิเบตอีกด้วย (ตารางที่ 1) (Huang *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในส่วนดอกเห็ดจะมีมากกว่าส่วนก้านเห็ด (Hur, 2008) ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 1 ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในส่วนต่างๆ ของเห็ดถั่งเช่าสีทองและเห็ดถั่งเช่าทิเบต

ตัวอย่าง	คอร์ไดเซปิน (มิลลิกรัม/กรัม)	อะดีโนซีน (มิลลิกรัม/กรัม)	รวม* (มิลลิกรัม/กรัม)	ที่มา
ดอกเห็ด ถั่งเช่าทิเบต	2.654 ± 0.02	2.450 ± 0.03	5.104	Huang *et al.* (2009)
เส้นใยเห็ด ถั่งเช่าทิเบต	0.904 ± 0.02	1.592 ± 0.03	2.496	
ดอกเห็ด ถั่งเช่าสีทอง	0.980 ± 0.01	1.643 ± 0.03	2.623	
ก้านเห็ด ถั่งเช่าสีทอง	3.6	0.6	4.2	Hur (2008)
ดอกเห็ด ถั่งเช่าสีทอง	9.7	1.8	11.5	

* ปริมาณคอร์ไดเซปิน + ปริมาณอะดีโนซีน

เห็ดถั่งเช่าสีทองประกอบด้วย 2 ส่วนคือส่วนที่เป็นเห็ดและส่วนที่ เป็นตัวหนอน ส่วนที่เป็นเห็ดมีลักษณะเล็กยาวคล้ายไม้เบสบอลเรียกว่าสโตรมา (stroma) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-4 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร บริเวณส่วนหัวมีลักษณะพองเล็กน้อย มีสีส้มอมแดงหรือสีส้มสว่าง รูปร่างลำต้นมีลักษณะคล้ายรูปทรงกระบอง บริเวณส่วนฐานเป็นตัวหนอนของแมลงที่เห็ดไปอาศัยและเจริญติดอยู่

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีบทบาทต่อร่างกายทางด้านต่างๆ ได้แก่ ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็งและเนื้องอก ต้านออกซิเดชัน ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดลิปิดในเลือด เป็นต้น เป็นต้น (Ng and Wang, 2005; Park *et al.,* 2009; Das *et al*., 2010; Jo *et al.,* 2010; Wu *et al*., 2010; Fu *et al*., 2013; Huang *et al*., 2013; Sun *et al*., 2014; Tuli *et al*., 2014; Yang *et al.,* 2015; Liu *et al*., 2016; Chen *et al*., 2017; Lin *et al.,* 2017; Luo *et al.,* 2017)

สารออกฤทธิ์ทางยาที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน (cordycepin and adenosine)

คอร์ไดเซปิน (สารอนุพันธ์ของอะดีโนซีนชนิดนิวคลีโอไซด์) และอะดีโนซีน นิยมใช้เป็นสารที่บ่งชี้คุณภาพด้านสรรพคุณทางยาของเห็ดถั่งเช่า มีงานวิจัยที่พบว่าปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความแข็งแรงของสายพันธุ์

วิธีการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม ระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH การกวนแสง รวมไปถึงขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์

2.เออร์โกสเตอรอล (ergosterol)

เป็นวิตามินดี 2 ที่พบได้ในฟังไจ จัดเป็นสารพวกสเตอรอลชนิดหนึ่ง ร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินดี 3 ได้ มีความสามารถในการช่วยให้กระดูกเจริญเติบโตและแข็งแรง นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการต้านมะเร็งและต้านออกซิเดชันอีกด้วย

3.โปรตีน

กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในส่วนดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ ไลซีน กรดกลูตามิก โพรลีน และทรีโอนีน (ตารางที่ 2) (Hur, 2008) โปรตีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีบทบาทต่อร่างกายดังนี้ ช่วยขยายหลอดเลือด ช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ ต้านมะเร็ง เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิ่มเลือด ต้านไวรัส ยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกในหนูทดลอง ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและช่วยยับยั้งเชื้อรา (Yang *et al*., 2015) มีเปปไทด์ชื่อว่าคอร์ดีมิน (cordymin)

4.กรดไขมัน

กรดไขมันในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนใหญ่ (ร้อยละ 70) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเกือบทั้งหมดเป็นกรดลิโนเลอิก (ร้อยละ 61) ดังตารางที่ 3 (Hur, 2008) ส่วน Reis *et al*. (2013) พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนร้อยละ 68.87 และมีกรดไขมันอิ่มตัวมีร้อยละ 23.04

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง)	ดอกเห็ด	ก้านเห็ด
กรดแอสพาร์ติก	4.75	0.36
ซีรีน	3.13	0.39
กรดกลูตามิก	8.79	1.40
ไกลซีน	1.84	0.52
ฮิสติดีน	1.84	0.46
อาร์จินีน	5.29	0.65
ทรีโอนีน	5.99	0.86
อะลานีน	5.18	0.98
โพรลีน	6.68	2.99
ไทโรซีน	3.39	1.27
วาลีน	3.46	0.65
เมไทโอนีน	0.18	0.07
ไลซีน	15.06	2.20
ไอโซลิวซีน	1.16	0.35
ลิวซีน	1.43	0.46
เฟนิลอะลานีน	1.15	0.42
รวม	69.32	14.03

ที่มา Hur (2008)

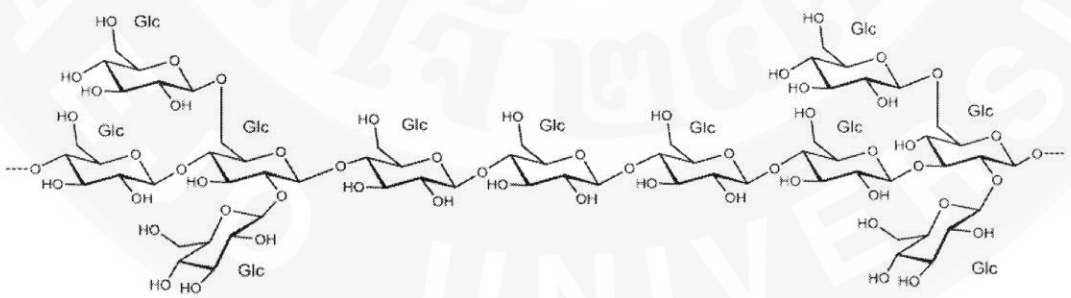
ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณกรดไขมันในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

กรดไขมัน (ร้อยละของกรดไขมันทั้งหมด)	ดอกเห็ด	ก้านเห็ด
กรดพาล์มิติก (C16:0)	24.5	21.5
กรดพาล์มิโตเลอิก (C16:1)	2.3	2.1
กรดสเตียริก (C18:0)	5.8	5.0
กรดโอเลอิก (C18:1)	6.0	17.7
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	61.3	33.0
กรดลิโนเลนิก (C18:3)	-	20.6

ที่มา Hur (2008)

5.พอลิแซคคาไรด์

พอลิแซคคาไรด์คือสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน โครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1,3) ไกลโคซิดิก ส่วนพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์พืชมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะเบต้า (1,4) ไกลโคซิดิก สำหรับสตาร์ชจะมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะอัลฟา (1,4) ไกลโคซิดิก สายโซ่หลักส่วนใหญ่ประกอบด้วยกลุ่มของ (1,2) อัลฟา-ดี-แมนโนไพราโนส สายกิ่งประกอบด้วย (1,3) (1,5) และ (1,6)-ดี-กาแลคโตฟูราโนส และ (1,4)-ดี-แกแลคโตไพราโนส (ลัดดา, 2563) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดถั่งเช่าทิเบต Glc = Glucose

ที่มา Nie *et al.* (2011)

ชนิดของพอลิแซคคาไรด์ที่พบมากในเห็ด ได้แก่ เบต้า-กลูแคน ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนใหญ่ และอาจมีน้ำตาลชนิดอื่นเป็นองค์ประกอบด้วย เช่น น้ำตาลกาแลกโตส แมนโนส อะราบิโนสและไซโลส และมีชื่อเรียกไปตามน้ำตาลที่มาเกาะ เช่น อะราบิโนกลูแคน ไซโลกลูแคนและแมนโนกาแลกโตกลูแคน เป็นต้น ถ้าดูเฉพาะชนิดของน้ำตาลพบว่าส่วนใหญ่ประกอบด้วยแมนโนส กลูโคส และกาแลกโตส ในอัตราส่วน 1.35 ต่อ 8.34 ต่อ 1.00 เชื่อมต่อด้วยพันธะอัลฟา-ไกลโคซิดิก ส่วน Reis *et al.* (2013) พบว่าน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ แมนนิทอลและเตรฮะโลส โดยมีในปริมาณร้อยละ 2.01 และ 24.71 ตามลำดับ สำหรับสารพวกคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่พบ ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดซิตริกและกรดฟูมาริก ในปริมาณร้อยละ 0.33, 7.97 และ 0.13 ตามลำดับ Wang *et al.* (2003) พบว่าชนิดของน้ำตาลในพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองได้แก่ กาแลคโตส แมนโนสและกลูโคส ในสัดส่วน 1.00 ต่อ 1.58 ต่อ 7.89 นอกจากนี้พอลิแซคคาไรด์ในเห็ดอาจจับอยู่กับโปรตีนด้วย (Friedman, 2016) ซึ่งการที่จับกับโปรตีนนี้ มีส่วนช่วยให้พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีประสิทธิภาพสูงในการดูแลร่างกายมากกว่าพอลิแซคคาไรด์จากแหล่งอื่น

ได้มีงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ดชนิดต่างๆ มีกิจกรรมทางชีวภาพในร่างกาย ทำให้มีการใช้พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าใช้เป็นยาสมุนไพรมาเป็นเวลายาวนาน มีฤทธิ์ทางยา ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านไวรัส และต้านออกซิเดชัน

Wen *et al.* (2006) ได้ศึกษาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในเห็ดถั่งเช่าชนิดต่างๆ พบว่ามีปริมาณร้อยละ 9.49, 3.23 และ 12.50 ในเห็ดถั่งเช่าชนิด *Cordyceps sobolifera*, *C. militaris* และ *C. sinensis* ตามลำดับ

5.1ประโยชน์ของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดต่อร่างกาย เห็ดสมุนไพรเป็นแหล่งพอลิแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางยาที่หลากหลาย สามารถรักษาโรคได้ จากการศึกษาพอลิแซคคาไรด์ในเห็ดที่รับประทานได้ส่วนมากไม่เป็นพิษ สามารถพัฒนาไปเป็นส่วนผสมอาหารฟังก์ชันและนูตราซูติคอลหรือเภสัชโภชนภัณฑ์ ส่งเสริมสุขภาพ บำบัดรักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ พอลิแซคคาไรด์ในถั่งเช่าสีทองพบว่ามีในปริมาณร้อยละ 3-8 ของน้ำหนักเห็ดถั่งเช่าแห้ง (Wen *et al.*, 2006) พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีประโยชน์ต่อร่างกายดังนี้

5.1.1ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ จับกับอนุมูลอิสระ สารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระที่ดี ได้แก่ อนุมูล 1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl (DPPH) อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการจับกับโลหะพวกเฟอรัสและรีดิวซ์เฟอริกได้ด้วย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ

ทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Li *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006)

พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดบางชนิด เช่น *Trocholoma lobayense* Heim สามารถจับกับ อนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าวิตามินซี (Liu *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่จับอยู่กับโปรตีนหรือเปปไทด์จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าที่ไม่ได้จับกับโปรตีนหรือเปปไทด์ด้วย (Huang *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014)

พอลิแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยต้านออกซิเดชันในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase; CAT) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GSH) นอกจากนี้ยังช่วยทางด้านช่วยลดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของลิปิด ส่งเสริมการสร้างและส่งเสริมการทำงานด้านกลืนกินของมาโครฟาจ ช่วยให้หัวใจทำหน้าที่ได้ดีขึ้นและช่วยบรรเทาความเสียหายจากการออกซิเดชันของร่างกาย (Wu *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013)

5.1.2ช่วยยับยั้งเนื้องอก โดยอาจมีบทบาทโดยตรงคือยังยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกหรือมีบทบาทโดยอ้อมคือช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และอาจมีบทบาทในการช่วยเสริมฤทธิ์การรักษาด้วยคีโม (Chen *et al.*, 2006) และช่วยป้องกันการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งได้

5.1.3ช่วยต้านการชรา ได้แก่ ทางด้านเมตาโบลิซึมและจุลินทรีย์ในลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันและความแก่ ต้านความเหี่ยวย่นของผิวหนัง

5.1.4ช่วยต้านการอักเสบ การอักเสบเป็นกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกาย โดยเมื่อเซลล์หรืออวัยวะเกิดการบาดเจ็บ ร่างกายจะหลั่งสารอักเสบออกมาเพื่อช่วยรักษาอาการบาดเจ็บดังกล่าว อย่างไรก็ตามถ้ามีการอักเสบเกิดมากเกินไปจะทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง และสุดท้ายทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ เช่น การเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น สารพอลิแซคคาไรด์สามารถช่วยต้านการอักเสบได้โดยช่วยยับยั้งการสร้างสารอักเสบของร่างกาย ได้แก่ tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) และ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์โดยกลไกการต้านออกซิเดชัน ช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลต่างๆ ที่เป็นพิษกับเซลล์ และช่วยกระตุ้นหรือเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ยับยั้งการออกซิเดชันและจับกับอนุมูลอิสระ (Mingyi *et al.*, 2019)

5.1.5ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีงานวิจัยที่พบว่าพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดช่วยส่งเสริมการทำงานของแมโครฟาจให้สามารถจับและกลืนกินเชื้อโรค สารพิษและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น กระตุ้นการทำงานของ natural killer cells ช่วยการเจริญเติบโตของเซลล์ม้าม เพิ่มปริมาณสาร Th1 cytokines ช่วยส่งเสริมการสร้างสารอินเตอร์ลิวคินต่างๆ และอินเตอร์ฟีรอน ซึ่งเป็นสารที่เสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดยังช่วยส่งเสริมการทำงานของต่อมไทมัสซึ่งเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย

5.1.6ช่วยต้านโรคเบาหวาน โดยช่วยในป้องกันความเสียหายของเบต้าเซลล์ของตับอ่อนเนื่องจากการที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไป และช่วยการฟื้นฟูเบต้าเซลล์ของตับอ่อนจากความเสียหาย ช่วยเพิ่มการเผาผลาญน้ำตาลของร่างกาย ช่วยในการสร้างไกลโคเจนของร่างกาย ช่วยชะลอการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ร้อยละ 54.3 และช่วยเพิ่มระดับอินซูลิน 1.64 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองตัวอย่างควบคุม (Choi *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูงหรือคอเลสเตอรอลชนิดดี ลดคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำหรือคอเลสเตอรอลชนิดเลว ช่วยลดภาวะดื้ออินซูลินได้อีกด้วย

5.1.7เป็นพรีไบโอติกส์ (prebiotics) พอลิแซคคาไรด์จากเห็ด ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก ซึ่งร่างกายไม่สามารถย่อยได้ จึงมีคุณสมบัติเป็นเส้นใยอาหาร พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดจะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ได้กรดไขมันสายสั้นซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับร่างกาย ช่วยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจึงสามารถจัดเป็นพรีไบโอติกส์ได้

5.1.8ช่วยบำรุงตับ โดยช่วยป้องกันการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในตับโดยช่วยป้องกันไม่ให้คอลลาเจนมากเกาะที่ตับและป้องกันการเกิดออกซิเดชันของลิปิด ลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ ป้องกันตับแข็ง ช่วยให้ตับทำงานได้ดีขึ้น เช่น เพิ่มความสามารถในการกำจัดสารพิษให้ตับเป็นต้น เพิ่มจำนวนเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระที่จะมาทำลายตับ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเป็นต้น ลดระดับเอนไซม์ ALT (alanine aminotransferase) และ AST (aspartate aminotransferase) ในเลือด ซึ่งถ้ามี ALT และ AST สูงแสดงว่าเซลล์ตับเกิดการบาดเจ็บหรืออักเสบ ค่าปกติจะอยู่ในช่วง 20-140 และ 8-64 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ

5.1.9ช่วยลดไขมันในเลือด เป็นการช่วยปกป้องหัวใจและตับ ลดคอเลสเตอรอลรวมและไตรกลีเซอไรด์ เพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดลิโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นสูงและมีบทบาทในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วย

5.1.10ลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ กลูโคไคเนส เฮกโซไคเนสและกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส เป็นต้น ช่วยลดไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในเลือด ลดการใช้น้ำตาลของเนื้อเยื่อไขมัน

5.2ปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของพอลิแซคคาไรด์สกัดจากเห็ด ได้แก่

5.2.1องค์ประกอบและโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ พอลิแซคคาไรด์จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งชนิดและปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีตามธรรมชาติของเห็ดแต่ละชนิดจะมีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ด ตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2018a, b) พบว่าน้ำตาลอะราบิโนสและกาแลคโตสช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับอนุมูล DPPH น้ำตาลไซโลสช่วยเพิ่มค่าความสามารถในการรีดิวซ์อิออนของเหล็กชนิดเฟอริก น้ำตาลกลูโคสช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เป็นต้น

Cheung *et al.* (2012) พบว่าการที่มีโปรตีนในพอลิแซคคาไรด์สกัดมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ด โดยได้สกัด 2 วิธีคือ ใช้น้ำร้อน (hot water extraction; HWE) และใช้อัลตราโซนิค (ultrasonic-assissted extraction; UAE) พบว่าใช้อัลตราโซนิคมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าและมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า ดังตารางที่ 4 แสดงปริมาณโปรตีนในสารสกัดทั้ง 2 แบบ ซึ่งการใช้อัลตราโซนิคทำให้โปรตีนในสารสกัดเพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 17.2-66.7 ซึ่งการทำแตกต่างไปตามชนิดของเห็ด ยังไม่ทราบกลไก ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ ที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน

	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)		
เห็ด	UAE	HWE	ร้อยละที่เพิ่มขึ้น
Grifola frondosa	33 $\pm$ 2.9	21 $\pm$ 0.3	57.1
Coriolus versicolor	25 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 0.7	66.7
Lentinus edodes	34 $\pm$ 0.3	29 $\pm$ 0.1	17.2

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n = 3); UAE = ultrasound assisted extraction; HWE = hot water extraction

ที่มา Cheung *et al.* (2012)

Leung *et al.* (2009) ได้วิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) จากการวัดความสามารถของสารในการจับกับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ กับปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8289 ผู้วิจัยได้แนะนาว่าการดัดแปลงสมบัติของโมเลกุลพอลิแซคคาไรด์โดยวิธีการทางเคมีจึงอาจเป็นทางเลือกที่มีประโยชน์ในการเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอลิแซคคาไรด์ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าการกำจัดสารที่มีโมเลกุลเล็กโดยวิธีการไดอะลิซิสและการกำจัดโปรตีนโดยวิธี Sevag ยังทำให้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันลดลงอีกด้วย

5.2.2สภาวะในการสกัดพอลิแซคคาไรด์ สภาวะในการสกัดพอลิแซคคาไรด์จะมีผลต่อผลผลิตที่ได้และความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย สภาวะดังกล่าว ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของตัวทำละลาย pH และระยะเวลาในการสกัด เป็นต้น ตัวอย่างเช่น UAE หรือ การให้ความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียสช่วยเพิ่มทั้งผลผลิตและความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cheung *et al.* 2012, Tan *et al.*, 2017) การสกัดด้วยกรดซิตริกได้สารสกัดที่สามารถจับกับอนุมูล DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน สารละลายเกลือหรือสารละลายด่าง (Yan *et al.*, 2018)

วิธีการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ด ตามปกติจะสกัดด้วยน้ำ สารละลายกรดหรือเบส สารละลายบัฟเฟอร์ ร่วมกับความร้อน สารสกัดที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี Sevage คือใช้สารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับ 1-บิวทานอลในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 แล้วไดอะไลซิส ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ก็จะได้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ตามต้องการ ร้อยละของผลผลิตและกิจกรรมทางชีวภาพจะขึ้นกับวิธีการและสภาวะในการสกัดที่ใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของสารละลาย pH และระยะเวลา ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วย (Mingyi *et al.*, 2019) การสกัดด้วยน้ำร้อน เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดและสะดวกที่สุด แต่มีข้อเสียคือต้องใช้อุณหภูมิสูง ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานและได้ผลผลิตต่ำ Shi *et al.* (2006) พบว่าวีการสกัดพอลิแซคคาไรด์โดยใช้น้ำและไมโครเวฟที่กำลังร้อยละ 80 นาน 20 นาที จะพอลิแซคคาไรด์สกัดหยาบร้อยละ 10.97

วิธีการใหม่ๆ ที่ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ subcritical water extraction (SWE), ultra-high pressure extraction (UPE), microwave extraction (ME) และ ultrasonic extraction (UE) โดยวิธีที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดร่วมด้วย และได้มีการนำไปใช้กับพืชหลายชนิด

การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดขึ้นกับขนาดอนุภาค ถ้าจะให้เห็นความแตกต่างของผลผลิต ขนาดอนุภาคควรมากกว่า 0.28 มิลลิเมตร ส่วนความสามารถในการต้านออกซิเดชันพบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัด ทำให้มีโปรตีนอยู่ในสารสกัดสูงกว่าและมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Cheung *et al*., 2012; Leung *et al*., 2009)

ขนาดโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ในสารสกัด ถ้ามีขนาดเล็ก ต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ อาจเนื่องจากมีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลในสารละลายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน โดยหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งพบว่าถ้าใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดร่วมด้วยจะได้ขนาดของพอลิแซคคาไรด์เล็กว่าที่สกัดด้วยน้ำร้อนตามปกติ (Cheung *et al*., 2012)

การสกัดร่วมกับการใช้เอนไซม์ผสม ประกอบด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส ทริปซินในอัตราส่วน 2 ต่อ 2 ต่อ 1 ในการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดยามาบูชิตาเกะ (*Hericium erinaceus*) ก่อนที่จะทำการสกัดด้วยน้ำร้อน ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง 2 รอบ เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว (ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์มาก่อน) หลังจากนั้นจึงทำให้เข้มข้นและตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียส เซนตริฟิวจ์เพื่อแยกตะกอนพอลิแซคคาไรด์ ทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนักผงพอลิแซคคาไรด์ที่ได้เทียบกับน้ำหนักเห็ดผงเริ่มต้น พบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้ได้ร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 67.7 (ได้ผลผลิตร้อยละ 13.46 $\pm$ 0.37) โดยพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบมีหมู่ฟังก์ชันเหมือนกัน แต่มีรูปทรงที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์นี้อาจช่วยเพิ่มร้อยละผลผลิตในเห็ดชนิดอื่นได้เช่นกัน สำหรับสภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้คือที่ pH 5.71 อุณหภูมิ 52.03 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 33.79 นาที (Zhu *et al*., 2014)

5.2.3สภาวะในการเพาะเลี้ยงเห็ด ได้แก่ อาหาร แสง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต้องมีความเหมาะสม โดยจะเป็นตัวควบคุมการสร้างสารออกฤทธิ์ทางยาให้มีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกัน (Leung *et al*., 2009; Singpoonga *et al.,* 2016; Lin *et al.,* 2017)

Leung *et al*. (2009) ได้เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) พบว่าช่วง 5-8 วัน เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่จะทำให้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากการวัดออกมาเป็นค่า TEAC (Trolox wquivalent antioxidant capacity) และ FRAP (ferric reducing antioxidant power) สูงสุด

5.2.4การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองมักต้องผ่านกระบวนการทำแห้งและบดเป็นผงก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการสกัดและศึกษาสมบัติทางด้านต่างๆ ต่อไป ปริมาณความชื้นและค่า water activity ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการทำแห้งแล้ว พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 3.26-3.56 และ 0.283-0.338 ตามลำดับ (Hur, 2008)

Wu *et al.* (2019) ศึกษาการทำแห้งเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวิธีการทำแห้งแบบอินฟราเรด (infrared drying) ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการทำแห้งที่ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสสามารถลดเวลาในการทำแห้งลงได้ร้อยละ 30, 40 และ 60 เมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีค่า water activity ต่ำกว่าด้วย ดังนั้นการทำแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้น เห็ดอบแห้งที่ได้จะเก็บได้นานขึ้น การทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียสจะได้เห็ดอบแห้งที่สามารถรักษาสีและสารประกอบที่ระเหยได้ดีกว่า การทำแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยลดรสขมและรสขมที่ตกค้างในปากได้ดีกว่า ผู้วิจัยได้สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งเห็ดถั่งเช่าสีทองคือที่ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 1 เมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถรักษาสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารอาหาร ได้แก่ ทองแดง เหล็ก สังกะสี มังกานีส ไว้ได้

6. สารประกอบพอลิฟีนอล

ชนิดของกรดฟีนอลิกที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ กรด ρ-hydroxybenzoic acid (paraben) และกรดซินนามิก โดยพบในปริมาณ 0.02 และ 0.11 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ

อนุมูลอิสระและสารต้านออกซิเดชัน (free radical and antioxidants)

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นโมโลกุลที่มีอิเล็คตรอนไม่ครบคู่ (unpaired electron) ไม่มีความเสถียร มีความว่องไวมากต่อการเกิดปฏิกิริยาดึงอิเล็คตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียง ทำให้โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงดังกล่าวเกิดความเสียหายได้ ถ้าเกิดในร่างกาย จะทำให้ร่างกายเกิดความเสียหายที่เนื้อเยื่อต่างๆ ส่งผลให้ร่างกายไม่แข็งแรง เกิดการอักเสบและเกิดโรคต่างๆ ได้ง่าย โดยเฉพาะโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) และโรคเบาหวาน เป็นต้น

อนุมูลอิสระในร่างกายอาจเกิดจากการได้รับจากอาหารโดยตรง หรือเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ จากกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ตามปกติของร่างกายในการเผาผลาญสารอาหาร กระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม หรือ

กำจัดเชื้อโรคของเซลล์เม็ดเลือดขาว และการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เป็นต้น ซึ่งจะมีอนุมูลอิสระเกิดมาด้วย เช่น สารประกอบออกซิเจน ไนโตรเจนและคลอรีน เป็นต้น ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อื่น ๆ ต่อเนื่องกันไป และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา หรือเกิดจากสิ่งกระตุ้นภายนอกร่างกาย เช่น มลพิษในอากาศ แสงแดด คลื่นความร้อน รังสีแกมมาและยาบางชนิด เป็นต้น

กลุ่มอนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน อนุมูลไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิล เป็นต้น เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญของร่างกายตามปกติ สารกลุ่มนี้จะสามารถทำลายโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดการเสียความคงตัวและเสียหาย ทำให้เกิดโรคต่างๆ ดังนั้นจึงเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ปกติร่างกายจะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้โดยเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้น เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นต้นหรือโดยสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ที่ได้รับจากอาหาร เช่น เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) วิตามินซีและวิตามินอี เป็นต้น แต่ถ้าหากร่างกายเสียสมดุลด้วยสาเหตุใดสาเหตุหนึ่ง เช่น ความเครียด ความเจ็บป่วย การขาดสารอาหารหรือการได้รับอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชันน้อยเกินไป การติดเชื้อและมลพิษในอากาศ เป็นต้น ก็จะส่งผลให้ในร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไป (oxidative stress) ทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ ดังกล่าวขึ้นมาได้ ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระออกซิเจนเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันชนิดที่มีความหนาแน่นต่ำในเลือด ทำให้เกิดเป็นไขมันชนิดมีความหนาแน่นต่ำที่ถูกออกซิไดซ์ ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจมาจับกินเกิดเป็นโฟมเซลล์เกาะอยู่ที่ผนังหลอดเลือด เมื่อมีจำนวนมากจะเกิดเป็นพลัคในหลอดเลือด ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (artherosclerosis) สุดท้ายอาจทำให้หลอดเลือดแตกได้จนกระทั่งเป็นอัมพาตหรืออาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ เป็นต้น

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่ทำลาย และ/หรือ ป้องกันอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่คือสารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ สารต้านออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์ เช่น เปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น สารต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินซีและวิตามินดี เป็นต้น วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก วิตามินซีมีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวมคือ การให้อิเล็กตรอน 1 ตัว ร่วมกับอะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เป็นการกำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระคือ R• ให้เป็น RH จากการกำจัดนี้จะได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไวต่ำคือ Asc•- (โอภาและคณะ, 2550) ส่วนวิตามินอีหรือโทโคฟีรอล เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมันจากโครงสร้างมีได้หลายไอโซเมอร์

หรือรูปแบบ โดยวิตามินอีที่อยู่ในรูปแอลฟา-โทโคฟีรอล เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุดจากบรรดาไอโซเมอร์ทั้งหมด วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลที่สำคัญของเมมเบรนซึ่งมีลิพิดเป็นองค์ประกอบ โดยปกป้องไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของลิปิด (โอภาและคณะ, 2550)

Reis *et al*. (2013) สกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเมทานอล แล้ววิเคราะห์ความสมบัติทางด้านต่างๆ ของสารสกัดเมทานอล พบว่าสารสกัดเมทานอลที่ได้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยสามารถยับยั้งการออกซิเดชันของลิปิด มีสมบัติในการรีดิวซ์ และสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้ ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดี สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์เนื้องอกต่างๆ ได้ ได้แก่ เซลล์เนื้องอกชนิด MCF-7 (เต้านม), NCl-H460 (ปอด), HCT-15 (ลำไส้ใหญ่) และ HeLa (ปากมดลูก) เป็นต้น

วิธีการวิจัย

1.สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง

- เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ได้รับจากโครงการย่อยที่ 1

2.วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, LA2035, Germany)
- ตู้อบลมร้อน (Tribest, SD-P9000/SD-S9000, U.S.A.)
- โถดูดความชื้น (desiccator) (GL32, Glaswerk Wertheim, Germany)
- เครื่องโซนิเคท (sonicator) (GT Sonic, VGT-1730QTD, China)
- เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dryer) (Heto Power Dry, DW8, Denmark)
- เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent 1100, U.S.A.)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Memmert, wnb 22, Germany)
- เครื่องปั่น(blender) (Panasonic, MX-J210GN, China)
- เครื่องปั่น (blender) (Tefal, BL309166, China)
- ไมโครปิเปต ขนาด 10-100 และ 20-200 ไมโครลิตร (Gilson, U.S.A.)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman, United Kingdom)
- ตะแกรงมาตรฐาน ขนาด 60 เมช
- ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเห็ด 24 ออนซ์
- หลอดทดสอบฝาเกลียว (Pyrex, Germany)
- บีกเกอร์ ขนาด 60, 100, 250 และ 600 มิลลิลิตร (Pyrex, Germany)
- เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3.สารเคมี

- 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Acetonitrile (Reag. Ph Eur, merck, Germany)

- Adenosine standard (Sigma, U.S.A.)
- Anthrone (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Cordycepin standard (Sigma, U.S.A.)
- Ethanol (A.R. Grade, RCI Labscan, Thailand)
- Ferric chloride ($FeCl_3$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Ferrous sulphate (A.R. Grade, Ajax,Australia)
- Ferrozine (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- Glucose standard (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Hydrogen peroxide 30% (ISO, merck, Germany)
- β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, U.S.A.)
- Potassium ferricyanide (AR/ACS, loba chemie, India)
- Potassium persulphate (A.R. Grade, Ajax,Australia)
- Phenol (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Phosphate buffer, pH 7.2 (merck, Germany)
- Phenazine methosulphate (PMS) (Sigma-Aldrich, srael)
- Sodium ethylenediaminetetraacetic acid
- Sulphuric acid, conc. 98% (A.R. Grade, RCI Labscan, Thailand)
- Trichloroacetic acid (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Trolox® [(S)-(2)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid] (Sigma-Aldrich, Germany

วิธีการวิจัย

1.ศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยง (แสง) ต่อปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สูตรอาหารดังนี้ มันฝรั่ง 200 กรัม/ลิตร น้ำตาลกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ยีสต์ 10 กรัม/ลิตร วิตามินบี 1 100 มิลลิกรัม/ลิตร $MgSO_4$ 0.5 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 0.5 กรัม/ลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัม/ลิตร ตับ 10 กรัม/ลิตรและดักแด้ 10 กรัม/ลิตร ภายใต้สภาวะแสงที่แตกต่างกัน 6 แบบ ให้เป็นตัวอย่าง T1-T6 ดังนี้ T1 = แสงสีขาว (หลอดยาว) T2 = แสงสีขาว (หลอดกลม) T3 = แสงสีน้ำเงิน T4 = แสงสีชมพู T5 = แสงสีแดง และ T6 = แสงสีผสม เพื่อให้เห็ดเจริญเติบโต จนกระทั่งได้ลักษณะดอกเห็ดที่เหมาะสมแก่การเก็บเกี่ยว พบว่าเห็ดไม่เจริญเติบโตภายใต้การเพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (หลอดยาว) (ตัวอย่าง T1) และแสงสีแดง (ตัวอย่าง T5) ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้เห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง T2 T3 T4 และ T6 นำเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 4 ตัวอย่างดังกล่าวไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Wu *et al.*, 2019) บดด้วยโถปั่นอาหาร ร่อนผ่านตะแกรง 60 เมช บรรจุในภาชนะปิดสนิท เก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์

1.1ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 ตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ดังนี้ ชั่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองผง 0.5 กรัม เติมสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 จำนวน 10 มิลลิลิตร สกัดด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองแยกกากด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายใสที่ได้ไปกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) โดยใช้ C18-reversed phase column ที่ flow rate 0.5 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลาย 0.05M KH2PO4: Methanol (85:15) ต่อสารละลาย acetonitrile = 95 ต่อ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้ UV-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 242 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน

2.ศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่าง T2 ที่ได้จากข้อ 1. มาทำการสกัดพอลิแซคคาไรด์โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเตรียมเห็ดถั่งเช่าสีทอง 2 แบบคือแบบที่สกัดและไม่สกัดไขมันออกก่อน และทำการสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์และไม่ใช้อัลตราซาวด์ ดังนั้นจะมีสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

ตัวอย่างที่ 2 สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

ตัวอย่างที่ 3 ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

ตัวอย่างที่ 4 สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

วิธีการสกัดไขมันทำดังนี้ นำเห็ดถั่งเช่าสีทองผงมาสกัดไขมันออกโดยการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ด้วยชุดกลั่นแบบ soxhlet ในอัตราส่วนของเห็ดผงต่อเอทานอลร้อยละ 80 เท่ากับ 1 ต่อ100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้เวลาสกัดนาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ระเหยเอทานอลร้อยละ 80 ออกไป แล้วนำกากที่ได้มาทำการสกัดซ้ำอีก 1 รอบ จะได้เห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดไขมันออกแล้ว

วิธีการสกัดพอลิแซคคาไรด์ นำเห็ดถั่งเช่าสีทองผง 20 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ใช้และไม่ใช้อัลตราซาวด์ แล้วทำไปแยกกากด้วยผ้าขาวบาง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 นำสารละลายใสที่กรองได้ ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จะได้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ตามต้องการ ทำ 3 ซ้ำ (replications)

2.1ร้อยละผลผลิต ชั่งน้ำหนักสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ คำนวณร้อยละของผลผลิตเปรียบเทียบกับน้ำหนักเห็ดถั่งเช่าสีทองผงเริ่มต้น

2.2ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน นำสารสกัดพอลิแซคคาไรด์มาวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, Improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ ดังนี้

2.2.1DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีของ Yang *et al.* (2015) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ให้มีเข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 mM DPPH (ละลายใน 95% เอทานอล) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 517 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง

DPPH เปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์เข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มา plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาสมการ regression คำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง DPPH ดังนี้

% การยับยั้ง = $(A_{517\ \text{ของตัวอย่างควบคุม}} - A_{517\ \text{ของตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น}}) \times 100 / A_{517\ \text{ของตัวอย่างควบคุม}}$

2.2.2Improved ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) ดังนี้ เตรียม ABTS radical cation stock solution ดังนี้ ชั่ง ABTS 0.0360 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.3784 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสม 7 mM ABTS 10 มิลลิลิตร กับ 140 mM $K_2S_2O_8$ 176 ไมโครลิตร ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของ ABTS radical cation stock solution : น้ำกลั่น 1:75 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายอนุมูล $ABTS^+$ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่มืดเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบกับ กรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์เข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มา plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาสมการ regression คำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2.2.3superoxide radical scavenging assay ทำตามวิธีของ Sasikumar and Kalaisezhiyen (2014) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 2mM NADH จำนวน 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 0.5 mM NBT จำนวน 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.03 mM PMS จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เปรียบเทียบกับ กรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์เข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มา plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาสมการ regression คำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

% inhibition = $(A_{562\ \text{control}} - A_{562\ \text{sample}}) \times 100 / A_{562\text{control}}$

2.2.4hydroxyl radical scavenging assay ทำตามวิธีของ Yan *et al.* (2018) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5mM $FeSO_4$ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 1% (v/v) H_2O_2 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร คนตลอดเวลา บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

เปรียบเทียบกับ กรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์เข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มา plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาสมการ regression คำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

2.2.5การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส (ferrous-ion-chelating activity) ทำตาม Zhang *et al.* (2013) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 3.7 มิลลิลิตร และ 2.0 mM $FeSO_4$ 0.1 มิลลิลิตร และ 5.0 mM ferrozine 0.2 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น positive control ใช้น้ำกลั่น เป็น blank นำค่าที่ได้มา plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง หาสมการ regression คำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

%ความสามารถการจับกับโลหะ = $(A_{562\ \text{ของน้ำกลั่น}} - A_{562\ \text{ของตัวอย่าง}}) \times 100 / A_{562\ \text{ของน้ำกลั่น}}$

2.2.6ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) ทำตามวิธีของ Yen and Chen (1995) วิธีนี้เป็นการดูความสามารถของสารละลายตัวอย่างในการรีดิวซ์สารประกอบเฟอริกไปเป็นเฟอรัส โดยทำตาม ferric-reducing antioxidant power (FRAP assay) ดังนี้ นำสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เติม 0.2 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.6 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมา 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร วางไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงว่า มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้มากขึ้นใช้กรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์เข้มข้น 0.4 0.6 0.8 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการทำกราฟมาตรฐาน ใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น AE (Ascorbic acid Equivalent) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ TE (Trolox Equivalent) (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Ranges Test (DMRT) ที่ $p \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

1.ศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยง (แสง) ต่อปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อนำเห็ดถั่งเช่าสีทอง 4 ตัวอย่าง ที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงที่แตกต่างกัน พบว่าแสงที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ (ตารางที่ 5) โดยตัวอย่าง T2 ที่เพาะเลี้ยงด้วยแสงสีขาว (หลอดกลม) มีปริมาณคอร์ไดเซปิน ปริมาณอะดีโนซีนและผลรวมของคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงที่สุด ดังนั้นจึงใช้ตัวอย่าง T2 ในการศึกษาตอนต่อไป

ตารางที่ 5 ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ปริมาณคอร์ไดเซปิน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ปริมาณอะดีโนซีน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ผลรวม (มิลลิกรัม/100 กรัม)
T2	711.81 ± 14.95^{a}	41.79 ± 6.99^{a}	753.60^{a}
T3	709.70 ± 154.62^{a}	37.45 ± 10.70^{b}	747.15^{a}
T4	643.57 ± 33.34^{b}	34.80 ± 1.32^{ab}	678.37^{b}
T6	616.85 ± 33.24^{b}	32.71 ± 4.20^{b}	649.56^{b}

หมายเหตุ ^{ab} = significantly different ($p \leq 0.05$) in the same column

2. สมบัติของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 ร้อยละของผลผลิต

ตารางที่ 6 แสดงร้อยละผลผลิตของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่มีผลต่อร้อยละของผลิตที่ได้ ($p>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 41.02 – 41.79

ตารางที่ 6 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ร้อยละของผลผลิต[ns]
1	41.12 ± 0.42
2	41.76 ± 0.38
3	41.02 ± 0.42
4	41.79 ± 0.50

หมายเหตุ [ns] หมายถึง not significantly different ($p>0.05$)

ตัวอย่างที่ 1 = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 2 = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 3 = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และตัวอย่างที่ 4 = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

2.2 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน นำสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มาวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, Improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7-10

ค่า IC_{50} เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ถ้าค่า IC_{50} ยิ่งต่ำ แสดงว่ายิ่งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ยิ่งดี จากตารางที่ 7 พบว่าตัวอย่างที่ 1 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้ทำการสกัดไขมันออกและไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยที่สุด ($p \leq 0.05$) ส่วนความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ พบว่าโทรล็อกซ์สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นกรดแอสคอร์บิก และสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่างที่ 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับ โดยตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ตัวอย่างที่ 4 ยังสามารถจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีกว่าตัวอย่างสารสกัดพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ ด้วย (ตารางที่ 10) แต่อย่างไรก็ตามยังน้อยกว่ากรดแอสคอร์บิกและโทรล็อกซ์ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 7 IC_{50} ของ DPPH และ $ABTS^{\bullet+}$ของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	DPPH	$ABTS^{\bullet+}$
1	0.862 ± 0.046^{e}	0.948 ± 0.001^{f}
2	0.606 ± 0.016^{b}	0.814 ± 0.002^{e}
3	0.780 ± 0.000^{d}	0.762 ± 0.002^{d}
4	0.664 ± 0.002^{c}	0.594 ± 0.001^{c}
กรดแอสคอร์บิก	0.481 ± 0.003^{a}	0.557 ± 0.001^{b}
โทรล็อกซ์	-	0.547 ± 0.001^{a}

หมายเหตุ ^{abcdef} = significantly different ($p \leq 0.05$) in the same column

ตัวอย่างที่ 1 = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 2 = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 3 = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และตัวอย่างที่ 4 = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

ตารางที่ 8 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	superoxide	hydroxyl
1	0.869 ± 0.001^{e}	1.115 ± 0.003^{f}
2	0.826 ± 0.004^{d}	0.870 ± 0.002^{e}
3	0.732 ± 0.000^{c}	0.757 ± 0.001^{d}
4	0.673 ± 0.001^{b}	0.685 ± 0.002^{c}
กรดแอสคอร์บิก	0.585 ± 0.001^{a}	0.551 ± 0.002^{a}
โทรล็อกซ์	0.600 ± 0.002^{a}	0.567 ± 0.001^{b}

หมายเหตุ ^{abcde} = significantly different ($p \leq 0.05$) in the same column

ตัวอย่างที่ 1 = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 2 = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 3 = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ และตัวอย่างที่ 4 = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยมีค่าสูงที่สุด แต่น้อยกว่า EDTA ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	0.926 ± 0.001^{e}
2	0.799 ± 0.003^{d}
3	0.685 ± 0.001^{c}
4	0.641 ± 0.002^{b}
EDTA	0.536 ± 0.000^{a}

หมายเหตุ ^{abcde} = significantly different ($p \leq 0.05$) in the same column

ตัวอย่างที่ 1 = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 2 = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 3 = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และตัวอย่างที่ 4 = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

ความสามารถในการรีดิวซ์ของตัวอย่างที่ 4 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยมีค่าสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ascorbic acid equivalent (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Trolox equivalent (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
1	0.259 ± 0.002^{d}	0.331 ± 0.002^{d}
2	0.292 ± 0.002^{c}	0.369 ± 0.002^{c}
3	0.305 ± 0.003^{b}	0.383 ± 0.003^{b}
4	0.373 ± 0.006^{a}	0.461 ± 0.005^{a}

หมายเหตุ ^{abcd} หมายถึง significantly different ($p \leq 0.05$) in the same column

ตัวอย่างที่ 1 = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 2 = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ ตัวอย่างที่ 3 = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และตัวอย่างที่ 4 = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลของแสงต่อปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทองใช้เป็นสารที่ชี้วัดคุณภาพของเห็ดถั่งเช่า โดยปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณคอร์ไดเซปิน ได้แก่ สูตรอาหาร วิธีการเพาะเลี้ยง ความแข็งแรงของสายพันธุ์ สภาพแวดล้อม ระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง รวมไปถึงขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์สาร (ณัฐพงศ์และคณะ, 2559; Hur, 2008)

ชนิดของแสงมีผลต่อปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยพบว่าตัวอย่าง T2 ซึ่งเป็นเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงภายใต้แสงสีขาว (หลอดกลม) มีทั้งปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 711.81$\pm$ 14.95 และ 41.79$\pm$ 6.99 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ส่วนงานของ Hur (2008) พบว่าปริมาณคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองในส่วนดอกเห็ดและส่วนก้านเห็ดมีค่าเท่ากับ 970 และ 360 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ สำหรับปริมาณอะดีโนซีนในส่วนดอกเห็ดและส่วนก้านเห็ด โดยมีค่าเท่ากับ 180 และ 60 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ (Hur, 2008) ซึ่งจะมีค่าสูงกว่าที่ได้จากการทดลองนี้ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะในการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ วิธีการสกัดและการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน

2. สมบัติของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1 ร้อยละของผลผลิต วิธีการเตรียมตัวอย่างไม่มีผลต่อร้อยละของผลิตที่ได้ โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 41.02 – 41.79 ($p>0.05$) การใช้อัลตราซาวด์ช่วยและไม่ช่วยในการสกัด รวมทั้งการสกัดไขมันออกและไม่สกัดไขมันออก ไม่มีผลต่อร้อยละผลผลิตไม่มากกว่า เนื่องจากเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน มีงานทดลองที่พบว่าการสกัดที่ได้ผลผลิตต่างกันเพราะเป็นเห็ดคนละชนิดกันทำให้มีสมบัติทางกายภาพต่างกัน ลักษณะการกระจายตัวในน้ำที่ดีจะช่วยให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการจับตัวเป็นก้อนในน้ำ ซึ่งทำให้สกัดยาก (Cheung *et al.*, 2012) นอกจากนั้นยังมีงานทดลองที่พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดจะได้ผลถ้าผงเห็ดมีขนาดเล็กพอ (Sun *et al.*, 2011) โดยได้สกัดเบต้าแคโรทีนจากเปลือกส้ม และผลผลิตจะเพิ่มขึ้นถ้าขนาดผงเล็กลง โดยถ้าเล็กกว่า 0.28 มิลลิเมตร ค่าผลผลิตที่ได้จะไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าเปรียบเทียบที่มากกว่า 0.28 มิลลิเมตร จะแตกต่างกัน โดยเกี่ยวกับ พื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดเล็กลงตามสมการ

$$K = \pi r^2 E$$

โดย K คือค่าคงที่ r คือเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค และ E คือผลผลิตของการสกัด ถ้าขนาดเล็กมากแล้ว การใช้อัลตราซาวด์ช่วยจะไม่มีผลในการเพิ่มผลผลิต เพราะผนังเซลล์ได้ถูกทำลายไปเรียบร้อยแล้วจากการลดขนาด และมีพื้นที่ผิวมากพอแล้ว (Sun *et al.*, 2011) ตามการทดลองนี้ได้บดจนเห็ดผงสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช หรือคือมีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.25 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดในการทดลองนี้จะได้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Cheung *et al.* (2012)

2.2 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน นำสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มาวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์

DPPH radical และ ABTS radical cation scavenging assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างโดยกลไกการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโทมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 และ 734 นาโนเมตร ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงมากแสดงว่ามีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้มาก ABTS radical cation scavenging assay อาจนำไปเปรียบเทียบกับ Trolox แล้วรายงานผลเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) (Sanchez, 2017) superoxide radical scavenging assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างในการจับกับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ทำให้เมื่อเติมสาร nitroblue tetrazolium (NBT) ลงไปเพื่อจับกับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ จะเกิดขึ้นน้อยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Sanchez, 2017) hydroxyl radical scavenging assay เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการไปจับกับอิออนของโลหะซึ่งเร่งการเกิดปฏิกิริยา Fenton ที่ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (Zhang *et al.*, 2013) ส่วนการวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการจับกับเฟอรัส โดยสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างจะมีบทบาทขัดขวางการจับกับเฟอรัสของสารประกอบเฟอโรซีน ทำให้การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอรัส-เฟอโรซีนลดลง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรก็จะลดลง มักทำเปรียบเทียบกับสาร EDTA (Zhang *et al.*, 2013) ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมต้านออกซิเดชัน ถ้าในตัวอย่างมีสารรีดักโตน (reductone) อยู่ ซึ่งสามารถเกิด

สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับสารโปตัสเซียมเฟอริไซยาไนด์ กรดไตรคลอโรอะซิติกและเฟอริกคลอไรด์โดยถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตรมีค่าสูง แสดงว่าตัวอย่างมีสารรีดักโตนสูงหรือมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์สูงนั่นเอง

การที่สารสกัดพอลิแซคคาไรด์แต่ละตัวอย่างมีค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่สูงในทุกรายการวิเคราะห์เนื่องจากสารสกัดในการทดลองนี้เป็นการสกัดแบบหยาบ ทำให้สารสกัดที่ได้อยู่ในรูปของพอลิแซคคาไรด์ที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า Cheung *et al*. (2012) พบว่าในสารสกัดที่มีการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีโปรตีนสูงกว่าที่สกัดโดยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด โดยจากเห็ด 3 ชนิดที่ได้ทำการศึกษามีปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ของตัวอย่างที่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดและที่ไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดเท่ากับร้อยละ 33, 25, 34 และ 21, 15, 29 ตามลำดับ ส่วนงานทดลองของ Leung *et al.* (2009) พบว่าปริมาณโปรตีนในพอลิแซคคาไรด์มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยแสดงเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) นอกจากนี้การใช้อัลตราซาวด์ยังเป็นการช่วยลดขนาดของโมเลกุล มีข้อมูลว่าขนาดของโมเลกุลที่เล็กลงหรือเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอาจจะมีผลทำให้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า เช่น การศึกษาในไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ (Tomida *et al*., 2009) และอัลจิเนต (Zhao *et al*., 2012) เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

1.เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยภายใต้แสงสีขาว (หลอดกลม) (ตัวอย่าง T2) มีปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงสุดเมื่อเทียบกับสภาวะแสงชนิดอื่น ($p \leq 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 711.81 $\pm$ 14.95 และ 41.79 $\pm$ 6.99 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ

2.ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร T2 ที่สกัดด้วยสภาวะที่ต่างกัน พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 41.02 – 41.79

3.ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร T2 ที่สกัดด้วยสภาวะที่ต่างกัน โดยการประเมินด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ DPPH radical scavenging assay, Improved ABTS radical cation decolorization assay, superoxide radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัสและค่าความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่ามีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$)

4.สารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อน ทั้งที่ใช้และไม่ใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัด มีความสามารถในการจับกับอนุมูล DPPH ดีกว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้สกัดไขมันออกก่อนและไม่ได้ใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัด ($p \leq 0.05$)

5.สารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อนและใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการจับกับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$, superoxide และ hydroxyl ดีกว่าตัวอย่างอื่น ($p \leq 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.594 ± 0.001, 0.673 ± 0.001 และ 0.685 ± 0.002 ตามลำดับ

6.ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส (Fe^{2+}) ของสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อนและใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัดมีค่าดีที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดไขมันออกก่อนและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

7.การนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาทำการสกัดไขมันออกก่อนสกัดและการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในระหว่างการสกัดสามารถทำให้สารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ดีขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาผลของสารประกอบโปรตีน-พอลิแซคคาไรด์ต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันในเชิงลึกให้มากยิ่งขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการเสริมประสิทธิภาพของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ และ/หรือ สารสกัดโปรตีน

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงาม พีระศักดิ์ ฉายประสาทและบุญส่ง แสงอ่อน. 2559. ผลของสูตรอาหารเทียมต่อการเกิดดอกและการผลิตสารสำคัญทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ฉบับพิเศษ**. 3: 34-46.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. **อาหารแห้ง**. ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. ค้นจาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1327/dried-food-%E0%B8%AD%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%81%E0%B8%AB%E0%B9%89%E0%B8%87 ค้นเมื่อ 6/11/2562.

ลัดดา แสงเดือน วัฒนศิริธรรม. 2563. โพลีแซคคาไรด์จากเห็ดสมุนไพร. **อาหาร**. 50(2): 33-41.

โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุญยะรัตน์และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. นิวไทยมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

Chen, C., X.-P. Liu, W. Jiang, B. Zeng, W. Meng, L.-P. Huang *et al*. 2017. Anti-effects of cordycepin to hypoxia-induced membrane depolarization on hippocampal CAI pyramidal neuron. **European Journal of Pharmacology.** 796: 1-6.

Chen, J., W. Zhang, T. Lu, J. Li, Y. Zheng and L. Kong. 2006. Morphological and genetic characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumour-bearing mice. **Life Science**. 78: 2742–2748.

Cheung, Y.C., K.C. Siu, Y.S. Liu and J.Y. Wu. 2012. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide–protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction. **Process Biochemistry**. 47: 892–895.

Choi, D., Y. Piao, S.-J. Yu, Y.-W. Lee, D.-H. Lim, Y.-C. Chang, et al. 2016. Antihyperglycemic and antioxidant activities of polysaccharide produced from *Pleurotus ferulae* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Korean Journal of Chemical Engineering**. 33: 1872–1882.

Das, S.K., M. Masuda, A. Sakurai and M. Sakakibara. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. **Fitoterapia**. 81(8): 961-968.

Friedman, M. 2016. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer and antibiotic properties in cells, rodents and humans. **Foods.** 5: 1-40.

Fu, L., Y. Wang, J. Wang, Y. Yang and L. Hao. 2013. Evaluation of the antioxidant activity of extracellular polysaccharides from *Morchella esculenta*. **Food and Function**. 4:871–879.

Hong, I.-P., P.-D. Kang, K.-Y. Kim, S.-H. Nam, M.-Y. Lee, Y.-S. Choi, N.-S. Kim, H.-K. Kim, K.-G. Lee and R.A. Humber. 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. **Mycobiology**. 38(2): 128-132.

Huang, Q. L., K.C. Siu, W.Q. Wang, Y.C. Cheung, and J.Y. Wu. 2013. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. **Process Biochemistry**. 48: 380–386.

Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zho. 2009. Determination and analysis of cerdycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. **African Journal of Microbiology Research**. 3(12): 957-961.

Hur, H. 2008. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris*. **Mycobiology**. 233-235.

Jo W.S., Y.J. Choi, H.J. Kim, J.Y. Lee, B.H. Nam, J.D. Lee, S.W. Lee, S.Y. Seo and M.H. Jeong. 2010. The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage. **Mycobiology**. 38 (1): 46-51.

Leung P.H., S.N. Zhae, K.P. Ho and J.Y. Wu. 2009. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus CS-HK1. **Food Chemistry.** 114: 1251-1256.

Li, S.P., K.J. Zhao, Z.N. Ji, Z.H. Song, T.T.X. Dong, C.K. Lo, J.K.H. Cheung, S.Q. Zhu and K.W.K. Tsim. 2003. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury. **Life Science**. 73: 2503–2513.

Lim, K., C.H. Lee and E. Chang. 2012. Optimization of solid state culture condition for the production of adenosine, cordycepin and d-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Astomycetes). **International Journal of Medicinal Mushroom**. 14(2): 181-187.

Lin L.T., Y.J. Lai, S.C. Wu, W.H. Hsu and .CJ. Tai. 2017. Optimal conditions for cordycepin production in surface liquid-cultured *Cordyceps militaris* treated with porcine liver extracts for suppression of oral cancer. **Journal of Food and Drug Analysis**. 1-10: 135-144.

Liu, Z., J. Xing, S. Zheng, R. Bo, L. Luo, Y. Huang, Y. Niu, Z. Li, D. Wang, Y/ Hu, J. Liu and Y. Wu. 2016. *Garnoderm lucidum* polysaccharides encapsulated in liposome as an adjuvant to promote Th1-bias immune response. **Carbohydrate Polymers** . 2016 142:141-8.

Leung, P.H., S. Zhao, K.P. Ho and J.Y. Wu. 2009. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. **Food Chemistry**. 114(4): 1251-1256.

Luo X., Y. Duan, W. Yang, H. Zhang, C. Li and J. Zhang. 2017. Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**. 157: 794–802.

Luerdara K., J. Kulsarin, S. Buranapanichpan and T. Tapingkae. 2015.Growth of gold Cordyceps (*Cordyceps militaris*) on pupae of Nanglai Thai native silkworm and Eri silkworm. **Journal of Agriculture**. 32 (1): 95 – 102.

Mingyi, Y., T. Belwal, H.P. Devkota, L. Li and Z. Luo. 2019. Trends of utilizing mushroom polysaccharides (MPs) as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**. 92: 94-110.

Nie, S.P., S.W. Cui, A.O. Phillips, M.Y. Xia, G.O. Phillips, S. Al-Assat and X.L. Zhang. 2011. Elucidation of the structure of a bioactive hydrophilic polysaccharide from *Cordyceps sinensis* by methylation analysis and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**. 84(3): 894-899.

Ng, T.B., Wang, H.X., 2005. Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 57: 1509–1519.

Park S.E., H.S. Yoo, C.Y. Jin, S.H. Hong, Y.W. Lee, B.W. Kim, S.H. Lee, W.J. Kim, C.K. Cho and Y.H. Choi. 2009. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*. **Food and Chemical**

Toxicology. 47: 1667–1675.

Reis F.S., L. Barros, R.C. Calhelha, A. Ciric, L.J.L.D. van Griensven, M. Sokovic and I.C.F.R. Ferreira. 2013. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**. 62: 91-98.

Ritdate J., A. Jansom, T. Vinijsanun, N. Tharawatcharasat. and P. Sawhasan. 2015. Effects of culture conditions on the fruiting body production of *Cordyceps militaris*. **Agricultural Science Journal**. 46 (3) (Suppl.): 701-704.

Sanchez, C. 2017. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushroom. **Synthetic and Systems Biotechnology**. 2(1): 13-22.

Sasikumar, V. and P. Kalaisezhiyen. 2014. Evaluation of free radical scavenging activity of various leaf extracts from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**. 3(2): 1000150.

Shi, Y., W.M. Wu, S.T. Liao, X.M. Liu and N.X. Zou. 2006. Study of the extraction of *Cordyceps militaris* polysaccharide with the use of microwave. **Guangdong Academy of Agricultural Sciences**. 11 :41–42 (in Chinese). *Cited by* S. Zhong, H. Pan, L. Fan, G. Lv, Y. Wu, B. Parmeswaran, A. Pandey and C.R. Soccol. 2009. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* Species. Food Technology and Biotechnology. 47 (3): 304–312.

Singpoong, N., P. Chaiprasart and B. Sangon. 2016. Effect of artificial culture media on *Cordyceps militaris* fruiting body formation and bioactive compound production. **Songklanakarin Journal of Plant Science**. 3 (Suppl): 34-46.

Sun, Y, D. Liu, J. Chen, X. Ye and D. Yu. 2011. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*-β-carotene from citrus peels. **Ultrasonic Sonochemistry**. 18(1): 243-249.

Sun, X., Sun, Y., Zhang, Q., Zhang, H., Yang, B., Wang, Z., et al. 2014. Screening and comparison of antioxidant activities of polysaccharides from *Coriolus versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules.** 69: 12–19.

Tan, X., J. Sun,Z. Xu, H. Li, J. Hu, H. Ning, et al. 2017. Effect of heat stress on production and in-vitro antioxidant activity of polysaccharides in *Ganoderma lucidum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 41: 135–141.

Tomida, H., T. Fuiji, N. Farutani, A. Michihara, T. Yasufuku, K. Akasaki, T. Maruyama, M. Otagiri, J.M. Gebicki and M. Anraku. 2009. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. **Carbohydrate Research**. 344(13): 1690-1696.

Tuli, H.S., S. S. Sandhu, D. Kashyap and A.K. Sharma. 2014. Optimization of extraction conditions and antimicrobial potential of a bioactive metabolite, cordycepin from *Cordyceps militaris* 3936. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. 3(4): 1525-1535.

Wang, B.J., M. Wei and L.P. Zhang. 2003. Studies on structure and properties of water soluble polysaccharide from fruiting body of *Cordyceps militaris* (L.) Link. **Chemical Research in Chinese Universities.** 19: 37–40.

Wen, L., Y.L. Tang and P. Zhang. 2006. Assays on effective ingredients in different parts of *Cordyceps sobolifera*. **Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine**. 27: 45–46 (in Chinese). *Cited by* S. Zhong, H. Pan, L. Fan, G. Lv, Y. Wu, B. Parmeswaran, A. Pandey and C.R. Soccol. 2009. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* Species. Food Technology and Biotechnology. 47 (3) 304–312.

Wu, X., M. Zhang and Z. Li. 2019. Influence of infrared drying on the drying kinetics, bioactive compounds and flavor of *Cordyceps militaris*. **LWT-Food Science and Technology**. 111: 790-798.

Wu, Q., Z. Tan, H. Liu, L. Gao, S. Wu, J. Luo, et al. (2010). Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice. **International Journal of Biological Macromolecules**. 46: 284–288.

Yan, J.K., Z.C. Ding, X. Gao, Y.Y. Wang, Y. Yang, D. Wu, et al. 2018. Comparative study of physicochemical properties and bioactivity of *Hericium erinaceus* polysaccharides at different solvent extractions. **Carbohydrate Polymers**. 193: 373–382.

Yang, Q., Y. Yin, G. Yu, Y. Jin, X. Ye and A. Shrestha. 2015. A novel protein with anti-metastasis

activity on 4T1 carcinoma from medicinal fungus *Cordyceps militaris*. **International Journal of Biology Macromolecules**. 80: 385-391.

Yen, G.C. and H.Y. Chen. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43:27-32.

Ying, J., Mao, X., Mao, Q., Zong, Y., Wen, H., 1987. **Icons of Medicinal Mushroom from China**. Science Press, Beijing, China. 575p.

Zhang, Z., Q. Jin, G. Lv, L. Fan, H. Pan and L. Fan. 2013. Comparative study on antioxidant activity of four varieties of *Flammulina velutipes* with different colour. **International Journal of Food Science and Technology**. 48: 1057–1064

Zhang, A., J. Deng, S. Yu, F. Zhang, R. J. Linhardt and P. Sun. 2018a. Purification and structural elucidation of a water-soluble polysaccharide from the fruiting bodies of the *Grifola frondosa*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 115: 221–226.

Zhang, L., Y. Hu, X. Duan, T. Tang, Y. Shen, B. Hu, et al. 2018b. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from thirteen boletus mushrooms. **International Journal of Biological Macromolecules**. 113: 1–7.

Zhao, X., B. Li, C. Xue and L. Sun. 2012. Effect of molecular weight on the antioxidant property of low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*. **Journal of Applied Phycology**. 24: 295-300.

Zhu, Y., Q. Li, G. Mao, Y. Zou, W. Feng, D. Zheng, W. Wang, L. Zhou, T. Zhang, J. Yang, L. Yang and X. Wu. 2014. Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. **Carbohydrate Polymers.** 101: 606-613.