สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์

Extracted Ganoderma lucidum Spore Obtained from Community Enterprise “Farm Haid Klang Ban” for Being Used as A Key Ingredient in Cosmetic Products

นางสาวดวงฤทัย นิคมรัฐ (หัวหน้าโครงการ)
นางสาวภัทริกา สูงสมบัติ
นางณัฐชมัย ลักษณ์อำนวยพร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

หัวข้อวิจัย สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์

ชื่อผู้วิจัย นางสาวดวงฤทัย นิคมรัฐ นางสาวภัทริกา สูงสมบัติ นางณัฐชมัย ลักษณ์อำนวยพร

หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ปีงบประมาณ 2563

บทคัดย่อ

ทีมผู้วิจัยได้มีแนวคิดต้องการพัฒนากระบวนการกะเทาะและสกัดสารสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง เพื่อการนำไปเป็นสาระสำคัญองค์ประกอบในสบู่ก้อน สบู่เหลว เพื่อทำการถ่ายทอดองค์ความรู้ดังกล่าวให้แก่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี ในรูปของผลิตภัณฑ์สบู่ก้อนและเหลว พร้อมทั้งการศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดงดังกล่าว

จากการพัฒนากระบวนการกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือแดงเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าดอกเห็ดหลินจือเอง ซึ่งประกอบด้วย การ Freezing ที่ -20°C เป็นเวลานาน 2 วัน แล้วทำการ bead beating เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วหมัก spore ด้วยเชื้อ Lactobacillus spp. ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นกระบวนการกะเทาะสปอร์ที่ง่ายไม่ยุ่งยาก แต่สามารถให้ประสิทธิภาพของการแตกหักของสปอร์มากกว่าร้อยละ 65 และให้สารสำคัญชนิด polysaccharides และ triterpenoids ในปริมาณสูง ในการสกัดสารสำคัญจากสปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดงได้เลือกการใช้ตัวทำละลาย ชนิดเอทานอลที่ละลายในน้ำกลั่น เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง สารสำคัญที่ได้ถูกนำไปเป็นองค์ประกอบในสบู่เบสชนิดก้อนที่เกิดจากกระบวนการ saponification พบว่าได้ผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง ที่สร้างความพึงพอใจและตอบรับจากผู้บริโภคระดับสูง เมื่องานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ถูกถ่ายทอดสู่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี พบว่าสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์ที่มีสารสำคัญของเห็ดหลินจือแดงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไป และคาดว่าสามารถทำการแปรรูปในรูปของสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดงในทางการค้าได้ ก่อเกิดการประยุกต์ใช้ในลักษณะของการบูรณาการของวิทยาศาสตร์และชุมชนที่มีองค์ความรู้ด้านการปลูกและแยกสปอร์เห็ดหลินจือแดงที่มีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงเป็นการช่วยก่อให้เกิดการพัฒนาวิสาหกิจชุมชน และจะนำไปสู่การพัฒนาการทางเศรษฐกิจอย่างยั่งยืนในอนาคตได้ทางหนึ่ง

Title Extracted Ganoderma lucidum Spore Obtained from Community Enterprise “Farm Haid Klang Ban” for Being Used As A Key Ingredient in Cosmetic Products

Name Ms. Duongruitai Nicomrat, Mr. Manoch Lakthandee
Insitute Faculty of Science and Technology, RMUTP
Year 2020

ABSTRACT

The research team aimed to develop the cracking and extracting processes for Ganoderma lucidum (Red Lingzhi) spores and transfer the technology in the form of soap bar and liquid products together with the cracking and extraction process to the community at Farm Haid Klang Ban in Pathumthani Province. From the study, since higher more bioactive compounds found in the aforementioned *Ganoderma* (Lingzhi) spore extracts over its basidiospore itself, the optimized breaking and extraction procedure were composed of freezing at -20^{o}C for 2 days, bead beating for 5 minutes, and then spore fermented with *Lactobacillus* spp. at room temperature for 24 hours. The processes could provide more than 65 percentages of the spore fracture efficiency and obtain more active substances such as polysaccharides and triterpenoids Moreover, the spore extraction process was required by shaking in ethanol dissolved in distilled water at the ratio 80:20 for 2 hours. The obtained bioactive Lingzhi spore extracts as one active ingredient was added into the saponification process to make soap bar and liquid product. It was found that the soap products could create satisfaction and good feedback from high-level consumers of the farm community in Pathumthani Province. The research should, therefore, be successfully applied in the form of commercial red lingzhi extract soap in the manner of integration of science and community with knowledge of efficient Red Lingzhi spore cultivation and separation. It can help the development of community enterprises can bring up sustainable economic development in the country in the future.

กิติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยเรื่องนี้ ทีมคณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำหรับทุนจากงบประมาณรายได้จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ที่ได้สนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้สามารถทำลุล่วงไปได้จนสำเร็จ และขอขอบคุณนักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากรธรรมชาติชั้นปีที่ 4 และ นายณัฐพล สัตถาผล ที่ได้ช่วยในขั้นตอนการเตรียมสารเคมี และการลงเชื้อติดตามงาน เก็บ ส่งตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ และการเก็บผลเพื่อการวิเคราะห์ ตรวจสาระสำคัญจากเห็ดหลินจือแดง และรวมถึงการทดสอบการเตรียมเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจาก ดร. สิริภัทร ชมัฒพงษ์ ผู้อำนวยการวิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
	1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
	1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	1.3 .ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
	1.4. สมมุติฐานของโครงการวิจัยนี้	2
	1.5. ระยะทำการวิจัย	3
	1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
	1.7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	4
บทที่ 2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
	2.1. ลักษณะทั่วไปของเห็ดหลินจือ	6
	2.2. คุณลักษณะของเห็ดหลินจือแดง	6
	2.3. พฤกษศาสตร์เกี่ยวกับเห็ดหลินจือแดง	7
	2.4. การเพาะพันธุ์เห็ดหลินจือ	8
	2.5. สปอร์เห็ดหลินจือแดง	9
	2.6. สารสำคัญจากเห็ดหลินจือแดง	10
	2.7. หลักการกะเทาะสปอร์เห็ดหลินจือ	12
	2.8. การตรวจสอบการแตกของสปอร์เห็ดหลินจือแดง	15
	2.9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	17
	3.1. สภาวะที่เหมาะสมในการกะเทาะเปลือกสปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดง	17
	3.2. การทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสปอร์เห็ดหลินจือแดง	19
	3.3. การผสมสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงผสมในสูตรสบู่ก้อนและสบู่เหลว)	23
	3.4. การถ่ายทอดผลงานและขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดสบู่ก้อนและเหลว และครีมบำรุงผิวให้ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน	24
บทที่ 4	ผลการทดลองและอภิปรายผล	26
	4.1. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสปอร์เห็ดลินจือแดง	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2. สารสำคัญจากสปอร์และเห็ดหลินจือแดง..... 29
4.3. การทำผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง..... 32
4.4. ความพึงพอใจและคุณสมบัติของสบู่สารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง..... 33
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ..... 36
5.1. คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย..... 36
5.2. การนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์..... 36
บรรณานุกรม..... 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 :. ความสามารถในการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี spectrophotometry 10
ตารางที่ 4.1 : ผลการกะเทาะสปอร์ด้วยวิธีการ freezing bead beatingและการหมักด้วยจุลินทรีย์..... 26
ตารางที่ 4.2 : ระยะการหมักสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วย Lactobacilli หลังการ freezing bead beating..... 27
ตารางที่ 4.3 : Total contents of polysaccharides in different parts of Lingzhi parts..... 29
ตารางที่ 4.4 : Total contents of triterpenoids in different parts of Lingzhi parts 30
ตารางที่ 4.5 : การทดสอบคุณลักษณะขอความชุ่มชื้นของผิวหน้าของผู้ทดสอบ หลังจากการใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง..... 32
ตารางที่ 4.6 : การทดสอบคุณลักษณะของผิวหน้าของผู้ทีทดสอบ หลังจากการใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง..... 33
ตารางที่ 4.7 : การทดสอบคุณลักษณะการสัมผัสจากผู้ทีทดสอบได้ใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง 33
ตารางที่ 4.8 : การทดสอบคุณลักษณะของความระคายเคืองจากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง..... 34
ตารางที่ 4.9 : การทดสอบคุณลักษณะการแพ้จากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง..... 35

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 : กรอบแนวคิดการทำวิจัย..... 3
ภาพที่ 2.1 : ตัวอย่างของเห็ดหลินจือแดง..... 7
ภาพที่ 2.2 : ตัวอย่างการแสดงตำแหน่งการสร้างสปอร์ในดอกเห็ด 9
ภาพที่ 2.3 : สปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดงปลูกในโรงเรือน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม 10
ภาพที่ 2.4 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านการกะเทาะเปลือกออกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM..... 12
ภาพที่ 2.5 : ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 13
ภาพที่ 2.6 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง 14
ภาพที่ 3.1 : อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสบู่จากสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง..... 24
ภาพที่ 3.2 : ระหว่างการเตรียมสบู่ด้วยกระบวนการ saponification..... 24
ภาพที่ 3.3 : การเตรียมสบู่ที่มีสารสกัดเติมสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดงและสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง..... 25
ภาพที่ 4.1 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... 28
ภาพที่ 4.2 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... .28
ภาพที่ 4.3 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... 28
ภาพที่ 4.4: ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... 29
ภาพที่ 4.5 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... 32
ภาพที่ 4.6 การเตรียมสบู่ที่มีสารสกัดเติมสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ซ้าย) และสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ขวา). 32
ภาพที่ 4.7 : การเตรียมส่วนผสมเพื่อการสกัดเหล็ดหลินจือในส่วนผสมน้ำ-เอทานอลและน้ำมันมะพร้าว..... 33
ภาพที่ 4.8 : ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง..... 33

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เห็ดหลินจือเป็นสมุนไพรจีน ได้รับสมญานามว่า ยาอายุวัฒนะ ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มคนรักษ์สุขภาพ และถูกขนานนามให้เป็น “ราชันย์เห็ดหมื่นปี ราชาแห่งสมุนไพร” ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางยาที่สำคัญนับร้อยชนิดจากการวิจัยหลาย ๆ ประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ และ ไทย พบว่าเห็ดหลินจือมีส่วนประกอบของสารที่เป็นประโยชน์มากมาย การรับประทานสปอร์เห็ดหลินจือจึงจำเป็นต้องทำการกะเทาะผนังหุ้มก่อน เพื่อให้สารสำคัญถูกสกัดออกจากสปอร์และดูดซึมเข้าร่างกายได้ เห็ดหลินจือได้รับความสนใจจากสถาบันวิจัยในวงการแพทย์ เนื่องจากมีสารสำคัญมากกว่า 150 ชนิด ที่มีสรรพคุณด้านช่วยบำรุงร่างกาย มีฤทธิ์สร้างภูมิต้านทานและรักษาโรคหัวใจ โรคไต โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง-ต่ำ โรคตับ ภูมิแพ้ และโรคมะเร็ง โดยสารที่สำคัญในในเห็ดหลินจือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ทั้งในทางตรงและทางอ้อม ทั้งนี้ส่วนที่มีสรรพคุณทางยามาส่วนมากเป็นส่วนของดอกเห็ดหลินจือ หรือนำดอกมาสกัดในรูปแบบผงและแคปซูลแล้ว แต่พบว่าส่วนของสปอร์เห็ดหลินจือมีสารที่คล้ายกันแต่เข้มข้นกว่าส่วนดอก มีคุณประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมหาศาล ที่จัดได้ว่าเป็นส่วนที่ดีที่สุด

ฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานีเป็นหนึ่งในวิสาหกิจชุมชน ที่เริ่มพัฒนากิจกรรมทางเศรษฐกิจโดยเริ่มต้นจากวิสาหกิจชุมชนขนาดเล็กด้วยตนเอง มีการสร้างอัตลักษณ์ของชุมชนผ่านการแปรรูปผลิตภัณฑ์เห็ด ซึ่งเป็นการจัดการสินค้า ได้แก่ เห็ด และเห็ดแปรรูป อย่างครบวงจร เริ่มตั้งแต่การเพาะเห็ดเพื่อการจำหน่ายเห็ดสด การแปรรูปเห็ดด้วยการถนอมอาหารวิธีต่าง ๆ การแปรรูปเห็ดด้วยการสกัดจากเห็ดหลินจือ มีความสนใจในการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่เกี่ยวข้องกับการใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น สบู่ โฟมล้างหน้า เนื่องจากฟาร์มเห็ดกลางบ้านมีความต้องการพัฒนาชุมชนต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ในระดับ OTOP ยังต้องการการสนับสนุนทางด้านวิชาการและและการต่อยอดทางด้านการผลิต การตลาด และการจัดการอย่างมีระบบ โดยได้เสนอว่าต้องการได้นวัตกรรมงานวิจัยในด้านการนำสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง เพื่อการนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์มีคุณภาพ ให้ได้หลากหลายประเภท

ทั้งนี้ทีมผู้วิจัยได้เล็งเห็นความต้องการนี้จากชุมชนดังกล่าว จึงได้มีแนวคิดต้องการศึกษาและพัฒนากระบวนการกะเทาะและสกัดสารสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง เพื่อการนำไปเป็นสาระสำคัญองค์ประกอบในสบู่ก้อน สบู่เหลว และครีมอาบน้ำ โดยทีมผู้วิจัยจะทำการถ่ายทอดองค์ความรู้ดังกล่าวให้แก่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน ซึ่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ได้ดังกล่าวจะเป็นการประยุกต์ใช้ในลักษณะของการบูรณาการของวิทยาศาสตร์และชุมชนที่มีองค์ความรู้ด้านการปลูกและแยกสปอร์เห็ดหลินจือแดงที่มีประสิทธิภาพด้วย อันเป็น

การช่วยก่อให้เกิดการพัฒนาวิสาหกิจชุมชน และจะนำไปสู่การพัฒนาการทางเศรษฐกิจอย่างยั่งยืนในอนาคตได้ทางหนึ่ง

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1. เพื่อศึกษาวิธี และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดงจากที่ได้จากฟาร์มเห็ดกลางบ้าน

1.2.2. เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดง

1.2.3. เพื่อพัฒนาสารสกัดจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดงเพื่อการใช้เป็นส่วนผสมหลักในผลิตภัณฑ์สบู่ก้อนและเหลว และครีมอาบน้ำทีมีสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

- สปอร์เห็ดหลินจือแดงจากชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จ. ปทุมธานี

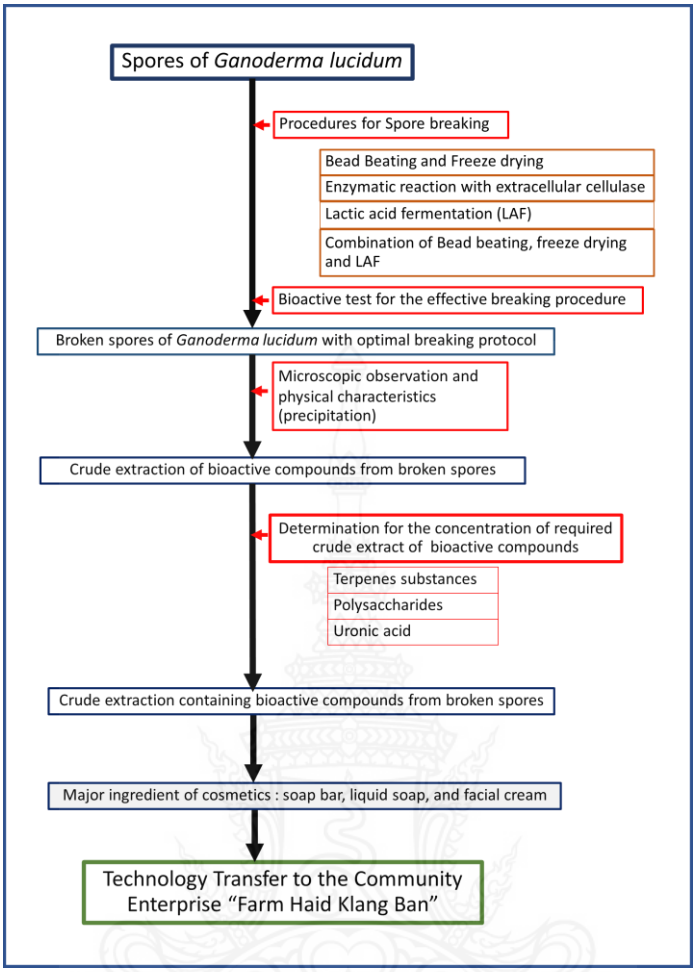
สถานที่

- สถานที่ทำ: การเตรียมและการสกัดสารสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยวิธีที่เหมาะสมและการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดหลินจือแดง ที่ศูนย์เทเวศร์ มทร.พระนคร

การทำผลิตภัณฑ์สบู่แข็งและเหลว และครีมอาบน้ำที่มีสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง ที่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จ. ปทุมธานี

1.4. สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

จากการศึกษาการสกัดสาระสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยวิธีที่เหมาะสมให้ได้สารสกัดเห็ดหลินจือแดง ด้วยแนวคิดที่ต้องการพัฒนากรรมวิธีจากวิธีที่มีอยู่ในปัจจุบันที่ประกอบด้วยการใช้ bead beating freeze drying และการใช้เอนไซม์ มาประยุกต์เลือกใช้ให้เหมาะสม และเพิ่มกระบวนการด้วยการใช้การหมักจากผ Lactic acid ที่จะสามารถช่วยให้ได้สารสกัดสำคัญจากสปอร์ได้มากขึ้น และสารสกัดที่ได้จากสปอร์เห็ดหลินจือแดง จะถูกนำไปเป็นสารสำคัญองค์ประกอบในเครื่องสำอางค์ประเภทสบู่ก้อน สบู่เหลว และครีมอาบน้ำ โดยทีมผู้วิจัยจะทำการถ่ายทอดองค์ความรู้ดังกล่าวให้แก่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน ซึ่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ได้ดังกล่าวจะเป็นการประยุกต์ใช้ในลักษณะของการบูรณาการของวิทยาศาสตร์และชุมชนที่มีองค์ความรู้ด้านการปลูกและแยกสปอร์เห็ดหลินจือแดงที่มีประสิทธิภาพด้วย อันเป็นการช่วยก่อให้เกิดการพัฒนาวิสาหกิจชุมชน และจะนำไปสู่การพัฒนาการทางเศรษฐกิจอย่างยั่งยืนในอนาคตได้ทางหนึ่ง ดังมีรายละเอียดของกรอบแนวคิดแสดงได้ใน**ภาพที่ 1.1**



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดการทำวิจัย

1.5 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

กิจกรรม/ขั้นตอนการดำเนินงาน	เดือนที่											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย												
2. เตรียมวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี วัตถุดิบ เพื่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดง												
3. ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือที่แตก												

4. นำสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงผสมในสูตรสบู่ก้อนและเหลว และครีมอาบน้ำ												
5. วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผลงานวิจัย												
6. นำเสนอผลงานและถ่ายทอดผลงานและขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สบู่ก้อนและเหลว และครีมอาบน้ำให้ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน												
7. รายงานผลและจัดทำรูปเล่มและนำเสนอผลงานสู่ระดับนานาชาติ												

1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์ – ผลิตภัณฑ์สบู่ก้อนและสบู่เหลว และครีมอาบน้ำที่มีสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง

1.6.2 ได้องค์ความรู้ใหม่ - ได้กระบวนการกะเทาะเปลือกสปอร์และสกัดสปอร์จากเห็ดหลินจือแดงเพื่อให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.6.3 ได้แนวทางเพิ่มอาชีพ และเพิ่มรายได้ให้แก่คนในชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี

1.7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลผลิต	ตัวชี้วัด			
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา	ต้นทุน (บาท)
1. นำเสนอผลงานในระดับชาติ/นานาชาติ	1 ครั้ง	งานประชุมระดับชาติ/นานาชาติ	หลังจากจบงานวิจัย	1,000
2. ถ่ายทอดนำเสนอวีธีการกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือแดเพื่อการทำเครื่องสำอางค์ ให้แก่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้านจังหวัดปทุมธานี	1 ครั้ง	สามารถทำได้เองในชุมชน	หลังจากจบงานวิจัย	3,000
3. จัดทำผลงานฉบับสมบูรณ์	1 ฉบับ	เพื่อเผยแพร่เป็นความรู้พื้นฐานเบื้องต้นให้กับผู้สนใจ	1 ฉบับ	1,000

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ มีเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.1 ลักษณะทั่วไปของเห็ดหลินจือ
2.2 คุณลักษณะของเห็ดหลินจือแดง
2.3 พฤกษศาสตร์เกี่ยวกับเห็ดหลินจือแดง
2.4 การเพาะพันธุ์เห็ดหลินจือ
2.5 สปอร์เห็ดหลินจือแดง
2.6 สารสำคัญจากเห็ดหลินจือแดง
2.7 หลักการ กะเทาะสปอร์เห็ดหลินจือ
2.8 การตรวจสอบการแตกของสปอร์เห็ดหลินจือแดง
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือสมุนไพรจีน ได้รับสมญานามว่า ยาอายุวัฒนะ ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มคนรักษ์สุขภาพ และถูกขนานนามให้เป็น “ราชันย์เห็ดหมื่นปี ราชาแห่งสมุนไพร ” ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางยาที่สำคัญนับร้อยชนิดจากการวิจัยหลาย ๆ ประเทศ เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ และ ไทย

เนื่องจากเห็ดหลินจือมีสาระสำคัญมากมาย ที่พบมากและที่สนใจคือ สารที่สามารถออกฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็งและโรคต่าง ๆ คือ สารโพลีแซ็กคาไรด์และไตรเทอร์พีนอยด์ โดยไตรเทอร์พีนมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ที่ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับการทำเคมีบำบัดและการฉายแสง บำรุงและ รักษาตับ ลดไขมัน ทั้งยังมีงานวิจัยในทั้ง In Vivo และ In Vitro สนับสนุนว่าสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของตับ และ Fibrosis สามารถนำไปใช้ในเครื่องสำอางคือทำให้รอยแผลเป็นที่เกิดจากผลของสารเคมีและอนุมูลอิสระ และยังมีสารโพลีแซคคาไรด์พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเสริมสร้างเม็ดเลือดขาว ช่วยลดอาการภูมิแพ้ ลดน้ำตาลในเลือด

2.2 คุณลักษณะของเห็ดหลินจือแดง

เห็ดหลินจือแดง (*Ganoderma lucidum*) (**ภาพที่ 2.1**) หรือที่รู้จักกันดีในประเทศไทย “เห็ดหมื่นปี เห็ดจวักงู” ชื่ออังกฤษ “Lacquered mushroom” ชื่อญี่ปุ่น “Mannantake” เป็นเห็ดราชนิดหนึ่งอยู่ได้หลายปี ก้านดอกออกด้านข้างหรือค่อนไปทางด้านข้าง ลักษณะคล้ายรูปทรงกระบอกที่ค่อยๆแคบลงส่วนล่าง ก้านดอกยาวได้ถึง 19 เซนติเมตร หนาได้ถึง 4 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลแดงถึงสีม่วงน้ำตาล และมีความมันเลื่อมเหมือนกับ

หลังดอกหมวก เห็ดมีลักษณะแข็งคล้ายเนื้อไม้รูปเหมือนรูปไต หรือรูปครึ่งวงกลมเกือบกลม กว้าง 12-20 เซนติเมตร หนาถึง 2 เซนติเมตร ด้านหลังดอกจะมีสีเหลืองแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงในที่สุด มีรอยย่นเหมือนคลื่นเป็นวงๆ ผิวมันเลื่อม ขอบดอกบางและสม่ำเสมอ เนื้อดอกสีขาวนวล ถึงสีน้ำตาลอ่อน ใต้หมวกจะเป็นแผ่นสีขาวหรือสีเหลืองนวลปิดครีบเห็ดไว้ หนาได้ถึง 1 เซนติเมตร ภายในมีรูพรุนเล็กๆ อยู่เป็นจำนวนมาก พื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร จะมีรูอยู่ถึง 4 – 5 รู ชั้นของรูอาจจะมีชั้นเดียวหรือพอกเป็นหลายชั้นลงมาด้านล่าง ภายในบรรจุสปอร์ (Xu et al, 2000)

ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างของเห็ดหลินจือแดง

2.3 พฤกษศาสตร์เกี่ยวกับเห็ดหลินจือแดง

เห็ดหลินจือแดง Ganoderma lucidum (Leyss. ex fr.) Karst. วงศ์ Polyporaceae (The State Pharmacopoeia Commission of P.R. China, 2005) ในท้องถิ่นของประเทศไทย และต่างประเทศ มีชื่อได้หลากหลายชนิด **ชื่อไทย** คือ เห็ดกระด้าง, เห็ดหิ้งขอ, เห็ดแม่เบี้ยงูเห่า, เห็ดจวักงูเห่า, เห็ดมะพร้าว (อานนท์, 2544) เห็ดนางกวัก เห็ดหัวงู, เห็ดเก้าอี้ลิง, เห็ดชะแล็ก, เห็ดสวรรค์พันปี, เห็ดหมื่นปี, เห็ดหิมะ, เห็ดต้นไม้แห่งชีวิต , เห็ดอมตะ, เห็ดเทพเจ้า, เห็ดศักดิ์สิทธิ์, เห็ดนำโชค (สาธิต, 2538) **ชื่อจีน** หลิงจือ, เล้งจือ, เช่อจือ, เฉียะจือ, หงจือ, อั๊งจือ, ตันจือ, ตังจือ (Xiao, 2002; 1979) **ชื่อญี่ปุ่น** แมนเนนตาเกะ (mannen-take), ไซไวตาเกะ (saiwai-take), ซารุนาวซิตาเกะ (sarunouchi-take), ไรชิตาเกะ (reishi-take) (อานนท์, 2544) **ชื่ออังกฤษ** reishi, lingzhi, monkey's seat mushroom, lacquered mushroom (อานนท์, 2544), divine mushroom, spiritual mushroom, tree of life mushroom, mushroom of immortality, good-fortune mushroom, holy mushroom (สาธิต, 2538), lucid ganoderma (Luo, 2003)

เห็ดหลินจือได้ถูกจัดให้เป็นราชาแห่งสมุนไพร (King of Herb) ชั้นสูงของจีนมาตั้งแต่โบราณ จนถึงยุคปัจจุบัน เห็ดหลินจือ ได้ถูกจัดเป็นตัวยาชั้นดี หรือยาที่มีความปลอดภัย แพทย์จีนโบราณเรียกหลินจือว่า "เชียนเฉ่า" แปลว่า"เห็ดเทพเจ้า" ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ รักษาสารพัดโรค (Xiao, 2002) โดยมีการแบ่งตามสีของดอกเห็ดออกเป็น 6 ชนิด ที่แต่ละชนิดมีสรรพคุณเด่นทางยาแตกต่างกัน ได้แก่ **หลินจือดอกสีแดง** (*Ganoderma*

lucidum) ซึ่งนิยมใช้ทางยาอย่างแพร่หลาย มีสรรพคุณบำรุงร่างกาย แก้หลอดลม อักเสบเรื้อรัง แก้โรคหัวใจ และช่วยให้นอนหลับ **หลินจือดอกสีดำ** (*Amauroderma rugosum*) ช่วยบำรุงไตขับปัสสาวะ **หลินจือดอกสีเขียว** (*Coriolus versicolor*) บำรุงตับ สายตาและประสาท **หลินจือดอกสีขาว** (*Fomitopsis officinalis*) ช่วยรักษาโรคภูมิแพ้ บำรุงประสาท **หลินจือดอกสีเหลือง** (*Laetiporus sulphureus*) ช่วยบำรุงม้ามและประสาท และ **หลินจือดอกสีม่วง** (Ganoderma sinensis, G. japonicum) ช่วยรักษาโรคไขข้ออักเสบ ผลงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์หลากหลายได้กล่าวถึงสรรพคุณของเห็ดหลินจือ โดยพบว่าในเห็ดหลินจือมีสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายประมาณ 200 ชนิด มีส่วนช่วยในการบำรุงร่างกาย ตลอดจนบรรเทาอาการต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น เสริมการรักษาให้กับผู้ป่วยมะเร็ง , มีส่วนช่วยลดผลข้างเคียงจากการทำเคมีบำบัดและการฉายแสง , ปรับสมดุลให้ความดันโลหิต , เสริมการรักษาในผู้ป่วยเบาหวาน ไปจนกระทั่งชะลอความแก่ และได้มีการตรวจสอบความปลอดภัยทางด้านพิษวิทยาของเห็ดหลินพบว่าไม่มีอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนั้นยังพบสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันภูมิคุมกันด้วยสาร Polysacchairde (Ooi and Liu, 2000) สามารถช่วยรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสและแบคทีเรียหลากหลายชนิดได้ดี ด้วยประสิทธิภาพการยับยั้งของสาร triterpenes จาก *G. lucidum* (Li and Wang, 2006)

2.4 การเพาะพันธุ์เห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือจะมีต้นกำเนิดจากประเทศจีน แต่ปัจจุบันพบว่าคนไทยเห็ดหลินจือสามารถปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ในประเทศไทย ไม่เพียงเฉพาะบนพื้นที่สูงที่มีอากาศเย็น และที่ผ่านมามีนักวิจัยของสถาบันต่างๆ ให้ความสนใจเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาของเห็ดหลินจือ เริ่มการทำโครงการวิจัยเห็ดหลินจือ ที่สวนจิตรดา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538-2550 ผู้พัฒนาสายพันธุ์เห็ดหลินจือพระราชทาน G2 และ G9 ตั้งแต่การเพาะปลูก การคัดสรรสายพันธุ์จากแหล่งที่ดีที่สุด ตลอดจนการวิจัยจนสามารถสกัดสาระสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาในเห็ดหลินจือเพื่อนำไปประกอบการรักษาผู้ป่วยร่วมกับการแพทย์แผนปัจจุบันได้เป็นผลสำเร็จ

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือแนวทางเกษตรที่เหมาะสมนั้นจะต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยได้แก่ ชนิดของสายพันธุ์ สถานที่เพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง แมลงและศัตรูพืช เป็นต้น การคัดเลือกสายพันธุ์ถือว่ามีความสำคัญมาก แต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตและปริมาณสารสำคัญไม่เท่ากัน บางสายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงแต่มีปริมาณสารสำคัญต่ำ ก็ไม่เหมาะสมที่จะนำมาทานเพราะมีสารสำคัญไม่ดีพอ นอกจากนั้นในการให้ได้สปอร์ที่มีคุณภาพจำเป็นต้องมีการคัดเลือกเห็ดหลินจือแดงสายพันธุ์ที่ดี เช่น G2

จากโครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองงาย โครงการตามแนวพระราชดำริ ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่างๆ ในช่วงปี 2551-2554 มีการศึกษาวิจัยกว่า 5 ปี เป็นโครงการแบบเบ็ดเสร็จเพราะทำการวิจัยตั้งแต่ต้นน้ำถึงปลายน้ำ เริ่มตั้งแต่การผลิตจนถึงมือผู้บริโภค พบว่าเห็ดหลินจือสายพันธุ์ MG-2 (เกิดจากการผสม เห็ดหลินจือแดง และ เห็ดหลินจือป่าสีม่วง ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์มีคุณสมบัติทางยาที่สูงมาก) เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมมากที่สุดในการผลิตเชิงพาณิชย์ เนื่องจากให้ผลผลิตดอกเห็ดที่สมบูรณ์มีสปอร์ปริมาณมาก และมีปริมาณสาระสำคัญสูง โดยได้พบว่าเห็ดหลินจือแดง G2 ผสมกับส่วนเห็ดหลินจือม่วงคือสายพันธ์ที่ขึ้นตามป่า นำมา

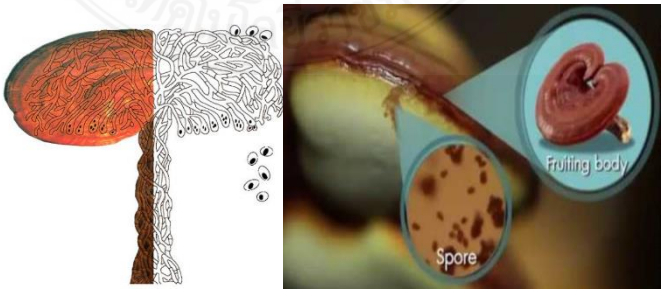
เพาะเลี้ยงผสมสายพันธ์ได้สายพันธ์ใหม่ของโลกเรียกสายพันธ์ MG2 ทั้งนี้เห็ดหลินจือป่า(สีม่วง) จะมีสารทางยาที่รักษาโรคเกี่ยวกับต่อมไร้ท่อสูงเช่น ไทรอยด์ เก๊า เบาหวาน เป็นต้น ส่วนเห็ดหลินจือสีแดง จะมีสารทางยาเกี่ยวกับการเสริมภูมิคุ้มกันร่างกายสูง

2.5 สปอร์เห็ดหลินจือแดง

มีการพบว่าเห็ดหลินจือมีส่วนประกอบของสารที่เป็นประโยชน์มากมาย การรับประทานสปอร์เห็ดหลินจือจึงจำเป็นต้องทำการกะเทาะผนังหุ้มก่อน เพื่อให้สารสำคัญถูกสกัดออกจากสปอร์และดูดซึมเข้าร่างกายได้ เห็ดหลินจือได้รับความสนใจจากสถาบันวิจัยในวงการแพทย์ เนื่องจากมีสารสำคัญมากกว่า 150 ชนิด ที่มีสรรพคุณด้านช่วยบำรุงร่างกาย มีฤทธิ์สร้างภูมิต้านทานและรักษาโรคหัวใจ โรคไต โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง-ต่ำ โรคตับ ภูมิแพ้ และโรคมะเร็ง (Park et al., 1997; Wasser 2002; Cör et al., 2018) โดยสารที่สำคัญในในเห็ดหลินจือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ทั้งในทางตรงและทางอ้อมด้วยกลไก apoptosis (Wu et al., 2012) ทั้งนี้ส่วนที่มีสรรพคุณทางยามาส่วนมากเป็นส่วนของดอกเห็ดหลินจือ หรือนำดอกมาสกัดในรูปแบบผงและแคปซูลแล้ว แต่พบว่าส่วนของสปอร์เห็ดหลินจือมีสารที่คล้ายกันแต่เข้มข้นกว่าส่วนดอก มีคุณประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมหาศาล ที่จัดได้ว่าเป็นส่วนที่ดีที่สุด

สปอร์เห็ดหลินจือแดง คือ เมล็ดของเห็ดหลินจือที่เกาะอยู่ใต้หรือบนผิวบริเวณดอกเห็ด **(ภาพที่ 2.2)** เป็นส่วนที่มีผนังหุ้มเกาะสองชั้น คล้ายกับผงโกโก้ มีสีน้ำตาล รสจืด มีกลิ่นหอมของเห็ดอ่อนๆ สปอร์เมื่อมองด้วยตาเปล่าพบว่ามีลักษณะรูปไข่ ขนาดเล็กและละเอียดมาก(8.5-11.5 x 5-7 ไมครอน) มีผนังหนา 2 ชั้น โดยผนังชั้นนอกจะเรียบ ส่วนผนังชั้นในมีลักษณะยื่นออกคล้ายหนามเกาะกับผนังชั้นนอกเมื่อกะเทาะแล้วจะมีสีน้ำตาลเข้ม การนำเห็ดหลินจือมาทำความสะอาด และนำไปต้มหรืออบฆ่าเชื้อ สามารถทำให้สูญเสียสปอร์ไปได้ จากการศึกษาภาวะกรดในกระเพาะอาหารและภาวะเบสในลำไสเล็ก พบว่าไม่สามารถย่อยสลาย หรือกะเทาะเปลือกหุ้มสปอร์เห็ดหลินจือออกได้ (เปลือกหรือผนังหุ้ม 2 ชั้นของสปอร์เห็ดหลินจือมีความแข็งมาก) สปอร์เห็ดหลินจือเป็นส่วนที่ให้คุณประโยชน์มากที่สุด เพื่อสารสำคัญที่อยู่ภายในสปอร์จึงไม่สามารถปลดปล่อยออกมาได้ ดังนั้นจึงควรใช้

ประโยชน์จากสปอร์เห็ดหลินจือที่ถูกกะเทาะเปลือกแล้ว ได้สารส่วนของสปอร์เห็ดหลินจือที่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว โดยการทำการสกัดหรือใช้สารในสปอร์ หรือแตกตัวให้กับสปอร์เห็ดหลินจือเสียก่อน



ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างการแสดงตำแหน่งการสร้างสปอร์ในดอกเห็ด

2.6 สารสำคัญจากเห็ดหลินจือแดง

ในการผลิตเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือ MG2 เพื่อให้ได้มาตรฐานการผลิตของขั้นตอน และเพื่อให้เห็ดหลินจือ MG2 นั้นมีคุณภาพดีที่สุด จำเป็นต้องมีการจัดการกระบวนการผลิต การเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาผลผลิตให้เคร่งครัด ทั้งในเรื่อง ความสะอาด และเทคนิคการทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์และสารปนเปื้อนต่างๆ จากน้ำ ดิน อากาศ ฯลฯ สภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสงสว่าง และโรงเรือน ตามข้อกำหนดตามแนวทางเกษตรที่ถูกต้อง และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้ปริมาณสาระสำคัญมากที่สุดทั้งในส่วนสปอร์และดอกเห็ด ต้องปลูกเป็นระยะเวลานานอย่างน้อย 110 วัน และเนื่องจากสปอร์เห็ดหลินจือมีขนาดเล็ก และมีปริมาณน้อยมากต่อเห็ดหลินจือ 1 ดอก เพื่อให้ได้สปอร์เห็ดหลินจือในปริมาณ 1 กรัม หรือ 1 ช้อนชา เพื่อการสกัด จำเป็นต้องใช้เห็ดหลินจือจำนวนมากถึง 10 กิโลกรัม (**ภาพที่ 2.3**)

ภาพที่ 2.3 สปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดงปลูกในโรงเรือน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลานาน 110 วัน

เป็นที่ทราบว่าในเห็ดทั่วไปประกอบด้วย น้ำ 90% โดยน้ำหนัก และมีส่วนที่เหลือประกอบด้วย 10% ที่มีองค์ประกอบหลักคือ 10-40% โปรตีน 2-8% ไขมัน 3-28% คาร์โบไฮเดรต 30-32% ไฟเบอร์ และ8-10% เถ้า และวิตามิน แร่ธาตุ พร้อมทั้งโพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซีรีเนียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง ส่วนสารสำคัญที่มีเฉพาะในเห็ดหลินจือมีดังนี้

1) ไตรเทอร์พีนอย (Triterpenoid) (Chen and Yu, 1993; Fukuzawa et al., 2008; Liu et al., 2013; Bhat et al, 2019)

ไตรเทอร์พีนอยเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ มีรสขม ส่วนใหญ่อยู่ที่ดอกและก้านของเห็ดหลินจือ สารไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นกลุ่มของสารประกอบกันประมาณ 100 ชนิด มีกรดกาโนเดอริค ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการการปฏิกิริยาภูมิแพ้ชนิดหนึ่ง ช่วยลดความดันโลหิต และช่วยลดไขมันในเลือด นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ และต้านสารพิษที่มีต่อตับ

2) **โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) (Zhou et al., 2007; Gao et al., 2012;)**

โพลีแซคคาไรด์เป็นสารที่ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันร่างกาย กระตุ้นการทางานและเสริมสร้างเม็ดเลือดขาว ช่วยต่อต้านอาการภูมิแพ้ มีส่วนช่วยในการเสริมสร้างเม็ดเลือดขาวให้เพียงพอในการต่อต้านโรคติดเชื้อต่างๆ ในผู้ป่วยที่ทาเคมีบำบัด สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เสริมสร้างการผลิตเม็ดเลือดขาว ช่วยบรรเทาอาการภูมิแพ้ และลดผลข้างเคียงของการทาเคมีบำบัดและการฉายแสงในผู้ป่วยมะเร็ง ช่วยบำรุงตับ ปกป้องตับจากสารพิษ ช่วยบรรเทาอาการตับอักเสบจากสารเคมี เชื้อโรค และแอลกอฮอล์ ช่วยขับพิษออกจากร่างกาย ช่วยชะลอการก่อตัวของเกร็ดเลือดและละลายลิ่มเลือด – บรรเทาอาการของหลอดเลือดหัวใจตีบ บรรเทาอาการของหลอดเลือดในสมองตีบ ลดความดันโลหิต และยังมีกรดกาโนเดอแรนส์ช่วยลดน้ำตาลในเลือด ส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้อินซูลิน ซึ่งทำให้บรรเทาอาการเบาหวาน

3) เยอร์มาเนียม (Germanium)

เยอร์มาเนียม พบมากในโสม กระเทียม และเห็ดหลินจือ เป็นตัวส่งเสริมขบวนการทางานของร่างกาย ช่วยกาจัดสาพให้เลือดและเซลล์มีออกซิเจนมากขึ้น ซึ่งานวิจัยหลายแห่งพบว่าเซลล์มะเร็งมักไม่ชอบเจริญเติบโตในที่ทีมีออกซิเจทีน สารเยอร์มาเนียมจึงนับเป็นตัวต่อต้านมะเร็งที่ดี

ประโยชน์ของสารสำคัญในสปอร์เห็ดหลินจือ (https://sukkaphap-d.com/สปอร์เห็ดหลินจือ-ส่วน/) มีตัวอย่างดังต่อไปนี้

1. สปอร์เห็ดหลินจือเหมาะกับผู้ป่วยที่ต้องพักฟื้นจากอาการป่วยของโรคหรือการผ่าตัด จะช่วยทำให้ร่างกายกลับมาแข็งแรงได้เร็วขึ้น

2. สปอร์เห็ดหลินจือมีสรรพคุณช่วยบำรุงร่างกายให้มีกำลัง บรรเทาอาการอ่อนเพลีย แก้อาการเบื่ออาหาร

3. สปอร์เห็ดหลินจือมีฤทธิ์ในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ ฯลฯ ช่วยต่อต้าน ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง

4. สปอร์เห็ดหลินจือมีสรรพคุณช่วยฟื้นฟูร่างกายให้แก่คนที่ผ่านการทำคีโมหรือเคมีบำบัด รวมถึงการฉายแสงไม่ให้มีผลข้างเคียงใดๆ

5. สปอร์เห็ดหลินจือทำให้ระบบการไหลเวียนเลือดและหัวใจดีขึ้น ซึ่งจะส่งผลดีต่อผู้มีภาวะโรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง-ต่ำ โรคอัมพฤกษ์-อัมพาต ไขมันสูง เป็นต้น

6. สปอร์เห็ดหลินจือมีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของร่างกาย ในผู้ที่มีปัญหาโรคเบาหวาน ช่วยลดน้ำตาลในเลือด ช่วยบรรเทาอาการของโรค และช่วยบำรุงร่างกาย ให้มีสุขภาพดีขึ้น

7. สปอร์เห็ดหลินจือทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคในร่างกายแข็งแรง มีประสิทธิภาพในการช่วยป้องกันโรคได้ดียิ่งขึ้น

8. สปอร์เห็ดหลินจือดูแลและรักษาอาการตับอักเสบ ช่วยบรรเทาอาการอักเสบ อีกทั้งทำให้พังผืดที่หดรัดตับคลายตัวลงด้วย

9. สปอร์เห็ดหลินจือมีสรรพคุณในการรักษาโรคไต และฟื้นฟูสมรรถภาพการทำงานของไตให้สามารถทำงานได้ดีขึ้น

10. สปอร์เห็ดหลินจือช่วยลดความเป็นพิษที่มีในเลือด ต่อต้านและกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย และยังช่วยเพิ่มปริมาณของออกซิเจนในเลือด

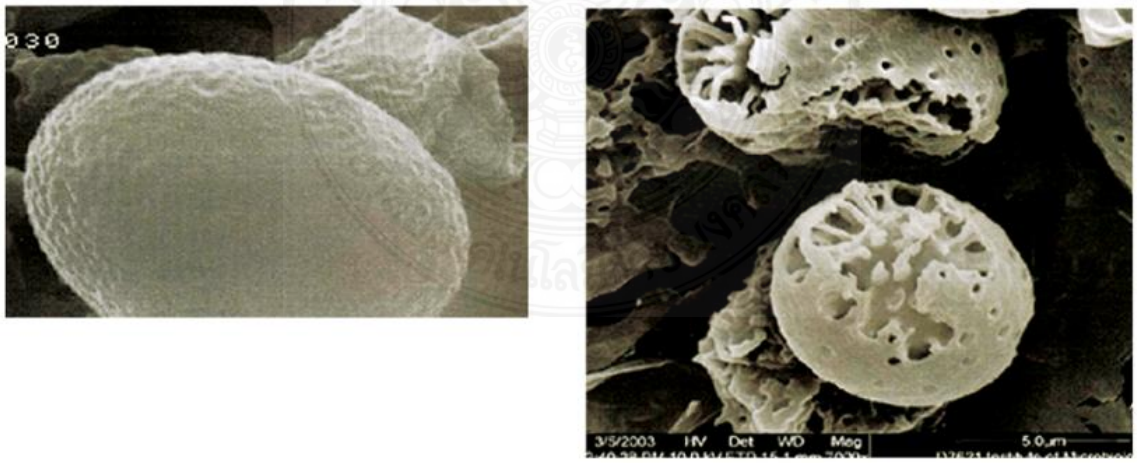
11. สปอร์เห็ดหลินจืออุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะช่วยชะลอความแก่ก่อนวัย ป้องกันไม่ให้เซลล์ภายในร่างกายถูกทำลาย

12. สปอร์เห็ดหลินจือมีฤทธิ์ช่วยป้องกันเส้นประสาทเสื่อม บำรุงสมอง และช่วยให้นอนหลับได้ง่ายขึ้น

13. สปอร์เห็ดหลินจือสามารถใช้ร่วมกับการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคภูมิแพ้ โรคลมชัก โรคพาร์กินสัน

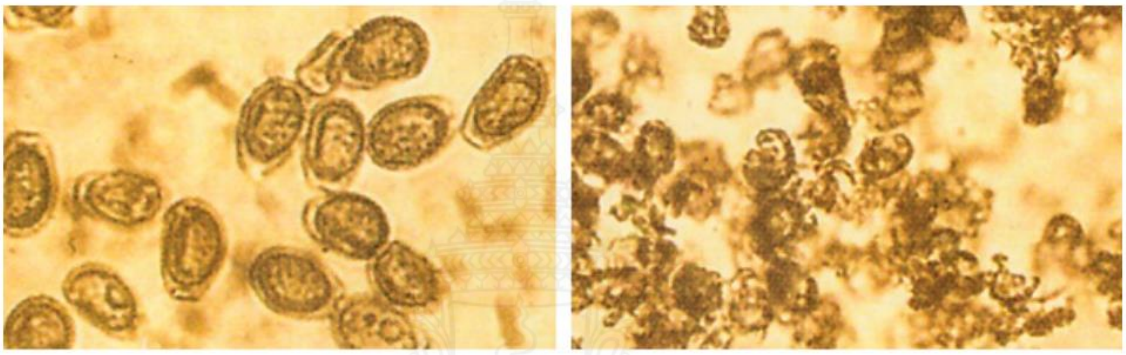
2.7 หลักการกะเทาะสปอร์เห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือสามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท คือโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoid)และเยอร์มาเนียม (Germanium) โดยสารสำคัญทั้ง 2 กลุ่มนี้จะพบส่วนใหญ่ในส่วนสปอร์มากกว่าส่วนดอกเห็ด และโดยเฉพาะสปอร์ที่ถูกกะเทาะเปลือก **(ภาพที่ 2.4)** มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และต้านมะเร็งได้ดีกว่า สปอร์ที่ไม่กะเทาะเปลือกและส่วนดอกถึงกว่า 20 เท่า



ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านการกะเทาะเปลือกออกจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM

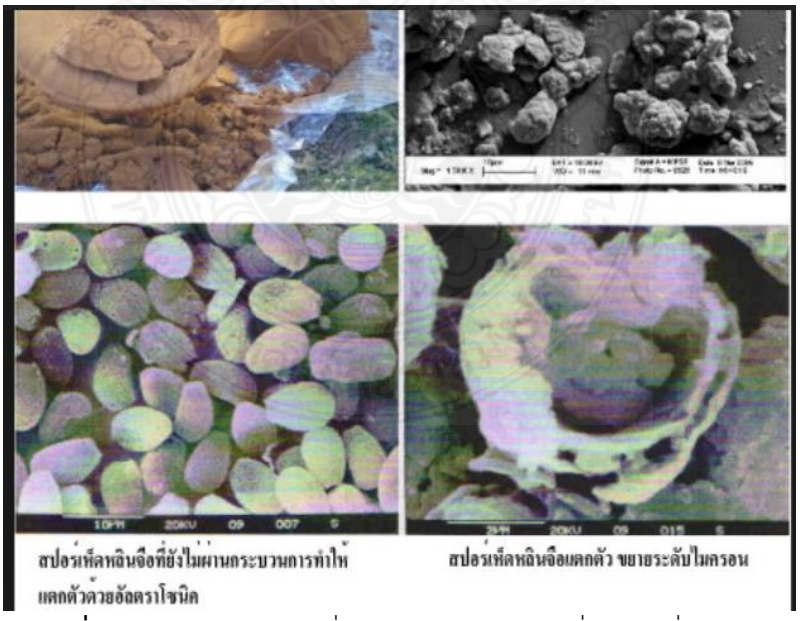
ลักษณะของสปอร์ที่ยังไม่กะเทาะ ชั้นผนังหนาเหล่านี้ไม่มีประโยชน์ต่อร่างกาย หากเรารับประทานเข้าไปจะไม่สามารถดูดซึมประโยชน์จากเห็ดหลินจือได้ จำเป็นต้องมีการกะเทาะเปลือกของสปอร์เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมเอาไปใช้งานได้ จากความแตกต่างของสปอร์ที่ผ่านการสกัด จากภาพ 8.4 ภาพซ้ายมือคือสปอร์เห็ดหลินจือขวามือคือสปอร์เห็ดหลินจือที่ถูกทำให้แตกลักษณะของสปอร์เห็ดหลินจือที่ถูกกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดออกเรียบร้อยแล้วนั้น เมื่อผ่านกล้องจุลทรรศน์จะเห็นได้ว่าเป็นลักษณะแตกๆ แหว่งๆ เว้าๆ แต่ยังคงมีบางส่วนที่ยังคงเป็นรูปร่างของสปอร์ที่ยังไม่กะเทาะส่วนน้อย ทั้งนี้เพราะในการบดละเอียดมากๆนั้น ยังเป็นไปได้ยากมากที่จะได้ลักษณะละเอียดเท่ากันหมด ส่วนมากเห็ดหลินจือที่นำมากะเทาะเปลือกสปอร์ออกให้เปลือกของสปอร์แตกละเอียด จะสามารถ กะเทาะเปลือกออกเพียงร้อยละ 90 (**ภาพที่ 2.5**) (Ma et al., 2012)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สปอร์เห็ดหลินจือ (ซ้าย) สปอร์เห็ดหลินจือที่ถูกทำให้แตก (ขวา)

วิธีการกะเทาะสปอร์เห็ดหลินจือแดง

ในการเตรียมให้ได้สาระสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือ จำเป็นต้องทำการกะเทาะเปลือกสปอร์ โดยสามารถทำได้หลายวิธี วิธีแรกคือ **การทำการกระแทกสปอร์** ด้วยหลักการเพื่อการกระแทกและการเสียดสี ที่มีการส่งผ่านพลังงานและลักษณะของตัวกลางที่ช่วยลดขนาดในรูปแบบที่แตกต่างกัน วิธีที่สองคือการบด ในการบด อาศัยหลักการตีด้วยเครื่องตีสปอร์และบอลล์มิลล์ ด้วยการบดสปอร์เห็ดหลินจือด้วยเครื่องบดชนิด Bead Ball Mill ในปริมาตรบรรจุ 1000 mL ที่มีสปอร์อยู่ครึ่งหนึ่ง พบว่า เมื่อทำการบดเป็นเวลานานถึง 36 ชั่วโมง ทำให้สปอร์แตกมาก1ประมาณร้อยละ 95 โดยสามารถทำได้ในระบบปิด ไม่เกิดการฟุ้งกระจายวิธีที่สามคือ การใช้คลื่นความถี่สูง (sonication) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากในปัจุบัน ที่อาจใช้ร่วมกับการ Freeze drying ก่อนเพื่อให้สปอร์แตกได้ง่ายมากขึ้น ดังแสดงได้จาก**ภาพที่ 2.6** และการใช้เครื่องตีสปอร์และบอลล์มิลล์ที่มีความสามารถในการกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือให้มีการแตกมากกว่าร้อยละ 95 และเมื่อตรวจสอบสารองค์ประกอบทางเคมีพบว่าปริมาณสารที่ถูกสกัดออกมาสูงกว่าสปอร์ที่ไม่ได้กะเทาะประมาณ 3-4 เท่า (เอกลักษณ์ อินทรักษา, 2553) และวิธีที่สี่ คือ การใช้ความร้อนและการใช้สุญญากาศ (Qiao et al., 2013) จากงานวิจัยของ ได้ทำการสกัดสารสำคัญจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง ด้วยโครงสร้าง spearoderm bilayer ที่ยืดหยุ่นของ ส่วน sporoderm ซึ่งมีลักษณะเป็น bilayer ที่แข็งมาก ทำให้เกิดความจำกัด ในการจำกัดปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ Polysaccharides และ triterpenes ผลลัพธ์ทางเภสัชวิทยาที่สมบูรณ์ ในการทำให้สปอร์แตกด้วยการต้มน้ำเดือด 15 L/ g ของสปอร์ เป็นเวาลานาน 2 hr และทำให้เข้มข้นภาตใต้สุญญากาศ แล้วนำไปผ่านการตกตะกอนด้วย anhydrous ethanol เมื่อได้สารสกัดจากเห็ดหลินจือได้มีการศึกษาคุณลักษณะของ ESGที่ผ่านการดัดแปลงจาก Qia et al. (2013). ซึ่งพบว่าเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดประมาณ 3.6 kDa



ภาพที่ 2.6 ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง

2.8 การตรวจสอบการแตกของสปอร์เห็ดหลินจือแดง (https://maanow.com/เรื่องน่ารู้/285-วิธีตรวจสอบเห็ดหลินจือ.html)

ในการทดสอบดูประสิทธิภาพการแตกของสปอร์ของเห็ดหลินจือแดงที่ผ่านกระบวนการ กะเทาะเปลือก สามารถทำได้ดังนี้

1. วิธีตรวจสอบแบบไม่ใช้กล้องจุลทรรศน์

วิธีตรวจสอบแบบไม่ใช้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีการที่ง่ายๆที่นิยมใช้เพื่อตรวจสอบเห็ดหลินจือตัวอย่างที่ได้ทำการซื้อมาเพื่อบริโภคนั้น สามารถทำได้เองโดยที่ไม่ต้องพึ่งกล้องจุลทรรศน์ สามารถทำได้โดยง่ายคือการนำน้ำธรรมดาใส่ในหลอดทดลอง หรือภาชนะใดๆที่มีลักษณะใสเพื่อให้เห็นความแตกต่างของเห็ดหลินจือที่นำมาทดลอง ดังนี้

ตัวอย่างสปอร์ที่ผ่านการกะเทาะเปลือก : เมื่อเทเห็ดสปอร์หลินจือลงในน้ำ จะค่อยๆจมลงมา แต่สีของน้ำนั้นจะมีลักษณะใสอยู่และเริ่มมีการตกตะกอนลงมาเรื่อยๆจนหมด น้ำก็ยังคงมีสีใสดังเดิม เพราะตะกอนที่ถูกกะเทาะแล้วจะหนักจึงจมลงไปในน้ำเป็นตะกอน ส่วนน้ำยังคงความใสดังเดิม

ตัวอย่างสปอร์ที่ไม่ผ่านการกะเทาะเปลือก : เมื่อเทสปอร์เห็ดหลินจือลงในน้ำมันจะฟุ้งกระจายอยู่ในน้ำ น้ำมีสีขุ่นออกเป็นสีน้ำตาลของเห็ด เพราะว่าสปอร์ที่ยังไม่ได้กะเทาะจะมีลักษณะเล็กมากจึงแขวนลอยอยู่ในน้ำ

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยปี 2551-2554 สถาบันการแพทย์แผนไทย-จีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ได้เป็นองค์หลักในการประสานงานกับหน่วยงานต่าง ๆ ได้แก่ โครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองงาย ในพระองค์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิต์ พระบรมราชินีนาถ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะแพทยศาสตร์ และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล และ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการวิจัยและพัฒนาเห็ดหลินจือตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงการใช้ประโยชน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เข้าร่วมโครงการฯ เป็นคณะทำงานการวิจัยเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือในระดับพรีคลินิก และคณะทำงานการพัฒนาผลงานการวิจัยเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือสู่การใช้ประโยชน์

จากงานวิจัย Gao et al., 2005 พบว่า เมื่อเลียนแบบสภาวะของกรดเหมือนกรดในกระเพาะ pH 1-3 โดยการเติมกรดเกลือ 0.1 N ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง และสภาวะลำไส้ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ผนังหุ้มของสปอร์เห็ดหลินจือหลังการทำปฏิกิริยากับกรด เกิดการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือเกิดการกร่อนและแตกบางส่วนเมื่อเทียบกับสปอร์ในสภาวะปรกติและโครมาโทแกรมของสารสกัดแอลกอฮอล์สปอร์เห็ดหลินจือที่ไม่กะเทาะผนังหุ้มในสภาวะกนดเทียบเท่ากับกระเพาะอาหาร ซึ่งในสภาวะกรดหรือด่างแบบสภาวะของกระเพาะและลำไส้ตามลำดับ ไม่สามารถทำลายผนังหุ้มของสปอร์ได้ มีปริมาณสารกลุ่ม

ไทรเทอร์ปีนน้อย สอลดคลืองกับกรณีผู้ป่วยที่โรงพยาบาลศิริราชที่มีรายงานว่ากินผงสปอร์เห็ดหลินจือที่มีขนาดและรูปร่างคล้ายกับไข่พยาธิ ร่างกายคนไม่สามารถย่อยผนังหุ้มได้ ดังนั้นในการกินสปอร์เห็ดหลินจือให้ได้ประโยชน์ จำเป็นต้องกะเทาะผนังหุ้มออกเสียก่อน เพื่อให้สาระสำคัญได้ถูกสกัดออกมาและดูดซึมเข้าร่างกายได้ดี

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (2556) ได้ชี้ให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการกะเทาะเปลือกของสปอร์เห็ดหลินจือ เมื่อทำการการศึกษา คุณภาพและปริมาณสารสำคัญของดอกเห็ดและสปอร์เห็ดหลินจือที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลบ่งชี้พันธุ์เห็ดหลินจือที่เหมาะสมในการปลูกในประเทศไทย โดยเน้นการนำไปทำยา มีการกะเทาะผนังหุ้ม แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญกลุ่ม terpenoids และสารกลุ่ม polysaccharides ผลการศึกษาคุณภาพและปริมาณสารสำคัญของดอกเห็ดและสปอร์เห็ดหลินจือพันธุ์ MG1, MG2, MG5 ในระยะเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมคือ 110 วัน และพันธุ์เห็ดที่มีปริมาณสารกลุ่ม polysaccharides สูงคือ พันธุ์ MG2 ในสปอร์ที่ กะเทาะผนังหุ้ม (4.77%) มากกว่าดอกเห็ด (3.06%) ส่วนพันธุ์ที่มีปริมาณสารกลุ่ม triterpenoids สูง คือ พันธุ์ MG5 โดยพบในก้านดอก (0.55%) มากที่สุด รองลงมาคือดอกเห็ด (0.40%) และสปอร์ (0.27%) ตามลำดับ และพันธุ์ไม้ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ด คือ ไม้ลำไย และไม้สะเดา และงานวิจัยนี้ได้พิสูจน์ว่าสปอร์ที่กะเทาะผนังหุ้มมีสารสำคัญและฤทธิ์ทางยาดีกว่าสปอร์ที่ไม่กะเทาะผนังหุ้ม ทั้งนี้เพราะว่าผนังหุ้มสปอร์มีผนังหนา 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ผนังชั้นในยื่นคล้ายหนามไปชนผนังชั้นนอก

ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายแอลกอฮอล์ หรือ dichloromethane ไม่สามารถสกัดสารสำคัญกลุ่ม triterpenoids ออกจากสปอร์เห็ดหลินจือที่ไม่กะเทาะผนังหุ้ม แต่การต้มสปอร์ที่ไม่กะเทาะผนังหุ้มด้วยน้ำจะสกัดสารกลุ่ม polysaccharides ได้บ้าง แต่ปริมาณน้อยกว่าสปอร์ที่กะเทาะผนังหุ้ม นอกจากนี้ในสภาวะที่เป็นกรด หรือเป็นด่าง เลียนแบบสภาวะของกระเพาะและลำไส้ ตามลำดับ ก็ไม่สามารถทำลายผนังหุ้มของสปอร์ได้ ซึ่งพิสูจน์ได้จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน และ TLC chromatogram ซึ่งสอดคล้องกับกรณีศึกษาที่เกิดขึ้นที่โรงพยาบาลศิริราชพยาบาล ที่ชี้ให้เห็นว่าการรับประทานสปอร์เห็ดหลินจือที่ไม่กะเทาะผนังหุ้ม ร่างกายคนไม่สามารถย่อยผนังหุ้มได้ ทำให้จึงยังคงพบสปอร์ในอุจจาระ ฉะนั้นการรับประทานสปอร์เห็ดหลินจือจึงต้องทำการกะเทาะผนังหุ้มก่อน เพื่อให้สารสำคัญถูกสกัดออกจากสปอร์และดูดซึมเข้าร่างกายได้ ซึ่งจะมีคุณค่าทางยาตามรายงานการวิจัยทางคลินิกหรือพรีคลินิกเมื่อผู้ป่วยคนหนึ่งที่รับประทานผงเห็ดหลินจือแล้วมีอาการท้องเสีย หลังจากหยุดการรับประทานผงเห็ดหลินจือ อาการต่าง ๆ ดีขึ้น

Ekperigin (2007) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย Acinetobacter anitratus และ Branhamella sp. สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดย *A. anitratus* สามารถย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 0.48 และ 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Branhamella* sp. ย่อย CMC และกลูโคสได้สูงสุดเท่ากับ 2.56 และ 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* (homology ร้อยละ 99) *Bacillus cereus* (homology ร้อยละ 91) และ *Enterococcus raffinosus* (homology ร้อยละ 99) เชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อย CMC ได้มี 9 สายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus thuringiensis Bacillus cereus Enterococcus raffinosus Enterobacter aerogenes Bacillus tequilensis Acinetobacter soli Enterococcus gallinarum Bacillus subtilis* และ*Enterobacter cloacae*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ มีขั้นตอนการทำงานในรายละเอียดการดังต่อไปนี้

3.1. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือแดง

3.2. การทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสปอร์เห็ดหลินจือแดง

3.3. การผสมสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงผสมในสูตรสบู่ก้อนและสบู่เหลว

3.4. การถ่ายทอดผลงานและขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางชนิดสบู่ก้อนและเหลว และครีมบำรุงผิวให้ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน

3.1. สภาวะที่เหมาะสมในการกะเทาะเปลือกสปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดง

วัสดุและสารเคมี

สปอร์เห็ดหลินจือแดงได้รับจากฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี สปอร์ที่เก็บได้ถูกอบที่ 50°C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ 4°C

ดอกเห็ดหลินจือแดง (basidiocarps, fruiting body) เห็ดหลินจือแดง และสปอร์ของเห็ดหลินจือแดง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เป็นฟาร์มปลอดสารเคมี ไม่มีการใช้ยาฆ่าแมลง ซึ่งปลูกในโรงเรือนแบบออร์กานิค ที่ปราศจากการใช้สารเคมีและยาฆ่าแมลง โดยใช้ขี้เลื่อยไม้ไผ่ และสูตรสำหรับการปลูกแบบ tissue culture เพื่อเปรียบเทียบผลการสร้างสารออกฤทธิ์เทียบกันระหว่างสารที่ได้จากการสารสกัดจากสปอร์ ไมซีเรียลจากการเพาะด้วยวิธี tissue culture และจากตัวเห็ด basidiocarp ที่เพาะเลี้ยงในวิธีดั้งเดิม

ไมซีเรียลเห็ดหลินจือแดง (mycelia) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบางกอกคอร์ไดเซพส์ จำกัด จังหวัดปทุมธานี เป็นฟาร์มปลอดสารเคมี ไม่มีการใช้ยาฆ่าแมลง

สารเคมีและวัสดุทางจุลชีววิทยาที่ใช้คือ Potato Dextrose Agar (PDA) Potato Dextrose Broth (PDB), ข้าวโพดหวาน, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $NaHPO_4$, CH_3OH, และน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ polysaccharide และ triterpenoids

เครื่องมือวัด

การตรวจวัดปริมาณ Polysaccharide การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสปอร์ โพลีฟีนอลทั้งหมดและสารไตรเทอร์พีนอยด์วิเคราะห์โดย UV-Vis spectrophotometer เตาอบ (Memert) ใช้สำหรับกระบวนการทำให้แห้งของไมซีเลีย

การเตรียมสารตั้งต้นสปอร์และเห็ดหลินจือแดง เพื่อใช้ในการสกัดสารสำคัญ

ไมซีเรียล (mycelia) ของเห็ดหลินจือแดง จากการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือแดง *Ganoderma* ที่เติบโตบนวุ้น PDA เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นนำไปเพาะใน ขวด Erlenmeyer ขนาด 100 มล แต่ละขวดบรรจุสารละลาย PDB ปริมาณ 25 มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 14 วัน ผลของศึกษาโดยใช้สารต้านอนุมูลอิสระโพลีฟีนอลรวม และไตรเทอร์พีนอยด์ของสารสกัด mycelia การเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดหลินจือแดงใน PDB และอาหารเลี้ยงชนิดข้าวโพดหวานที่อุณหภูมิตู้อบ (30°C) สารละลายข้าวโพดหวาน (ประกอบด้วย 5% สารสกัดจากข้าวโพดหวาน 0.2% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4$, 0.01% $NaHPO_4$) เส้นใย mycelia ที่โตถูกนำมากรองจากสารละลาย แล้วทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 50°C จนน้ำหนักคงที่ แล้วบด mycelia เป็นผง ก่อนการสกัดด้วย CH_3OH 50 มิลลิลิตร โดยการ sonication เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง. สารสกัดที่ได้จะถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No 1 แล้วทำให้สารสกัดแห้ง เรียกว่าสารสกัดเมทานอล MPDB (สารสกัดเมทานอลไมซีเลียลจาก G. lucidum ที่เพาะใน PDB) และMSC (สารสกัดเมทานอลไมซีเลียลจาก G. lucidum ที่ปลูกในข้าวโพดหวาน)

ก. การกะเทาะสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยวิธี bead vortexing

การ vortexing ด้วย zirconia/silica (ZS) bead

ตัวอย่างสปอร์เห็ดหลินจือแดงที่เตรียมที่ความเข้มข้น 28 มิลิกรัมต่อมิลิลิตร โดยใช้แบคเมนบัฟเฟอร์ (ประกอบด้วย 1.0% (v/v) Triton X100, 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 50 mM Na2SO3, 50 mM

Tris-HCl (pH 7.5), PVP-40 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase A 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร) นำสารละลายสปอร์ 0.25 มิลลิลิตรที่มีปริมาณ 10^8 -10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร วางในหลอดขนาด 1.7 มิลลิลิตรก่อนการทำใส่ชนิดของ bead zirconia/silica (ZS) bead แล้วทำการ vortex speed ที่ 1900 และ 3200 rpm โดนทำการหยุดเป็นระยะทุก ๆ 0.5, 1, 2, 4 และ 8 นาที นำสารละลายสปอร์ถูกนำไปเจือจางเพิ่มเติมเป็นเศษส่วน (เช่น 1/20 หรือ 1/40) เพื่อคำนวณความเข้มข้นของสปอร์ที่ไม่เสียหายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นของสปอร์ที่ไม่เสียหายเป็นค่าเฉลี่ยจากการสังเกตสปอร์ที่ไม่ถูกกะเทาะ

ข. การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดงแห้ง (*G. lucidum*) โดยการนำมาบดผ่านตะแกรง 2 มม. แล้วอบแห้งที่ความชื้น 8.26% แล้วนำผง G. lucidum ปริมาณ

40 กรัมละลายในน้ำ 2 ลิตร และแช่ในอ่างน้ำเพื่อสกัดที่อุณหภูมิ 70°C ก่อนการทำการสกัดที่อุณหภูมิ 100-130°C ในหม้อนึ่ง ส่วนเนื้อเห็ดที่เหลือจากการสกัดจะถูกกรองและหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที

ค. การสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยเชื้อ Lactobacillus spp.

การสกัดสารจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดงด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์และตัวทำละลาย

การหมักสารละลายสปอร์ ด้วย *Lactobacillus plantarum*

สปอร์ของ *Ganoderma lucidum* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/mL ปริมาณ 1 มิลลิลิตรและน้ำ sterile ปริมาณ 2 มิลลิลิตรหมักด้วย L. plantarum (NguyễnXuân Cương et al., 2013) พร้อมด้วยตัวอย่างควบคุม คือสปอร์ที่ไม่มี *L. plantarum* ทำการบ่มที่ 37°C แล้วเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการแตกของเปลือกสปอร์ของ Ganoderma โดยการนำตัวอย่างกรองโดยใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 สปอร์ที่ผ่านการย่อยและไม่ย่อยที่คงอยู่บนกระดาษกรองจะถูกทำให้แห้งที่ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ประสิทธิภาพ (ร้อยละ) ของการทำลายสปอร์ถูกกำหนดเป็นอัตราส่วนของความหนาแน่นของสปอร์ที่แตกและเริ่มต้นสปอร์และคูณด้วย 100 และสังเกตรูปสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของสปอร์ของ *G. lucidum* ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก สังเกตได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

สารสกัดจากสปอร์และส่วน basidocarp จากเห็ดหลินจือแดงด้วยวิธี hydroalcoholic extraction

การสกัดสารสกัดด้วยวิธี hydroalcoholic extraction

ในการเตรียมสารสกัดด้วยวิธี ไฮโดรอัลแอลกอฮอล์ สามารถเลือกทำได้ 2 ประเภท คือ ชนิดที่ 1) สารสกัดจาก basidiocarps จากส่วน spore จากเห็ดหลินจือแดงเทียบกับส่วนตัวเห็ดส่วน basidiocarp โดยการสกัดด้วยการใส่ในน้ำและแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 80:20) แล้วเขย่าเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง สารที่ได้นำมาวัดปริมาณความเข้มข้นที่ได้ก่อนการนำไประเหยให้ได้ความเข้มข้น 1 g / mL โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนที่ 19°C (Meneses et al.2016)

3.2 การทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสปอร์เห็ดหลินจือแดง

การทำให้ผงสปอร์แห้งผลของอุณหภูมิในการอบแห้งต่อสาระสำคัญ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผงสปอร์ถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิตั้งแต่ 95 ถึง 105°C จนถึงความชื้น 2 ถึง 3% ก่อนการนำไปวัดการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่การวัดปริมาณ polysaccharides จะอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50°C ไม่เกิน 6 ชั่วโมง

ก. การหาปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ทั้งหมด

ในการศึกษาหาปริมาณโพลีแซ็กคาไรด์ทั้งหมด สารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.3, 0.25, 0.2, 0.15 และ 0.1) มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เตรียมจากสารละลายสต็อกกลูโคส 1 มิลลิกรัม/มิลลิตร นำตะกอนของสปอร์ที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยปริมาณ 250 มิลลิกรัมละลายในน้ำร้อน 50 มิลลิลิตรได้ความ

เข้มข้น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะถูกนำมาศึกษาตามขั้นตอน (Chia et al., 2009) คือ การหาปริมาณฟีนอลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาล ปริมาณ Triterpene ปริมาณ polysaccharide ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาค่าพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) โดยวิธี Fehling

ในการตรวจสอบปริมาณของ polysaccharides ในรูปของกลูโคสโพลีเมอร์ของกลูโคปีราโนไซด์ (polymers of glucopyranosides) และโพลีแอลกอฮอล์ (polyalcohols) ที่มีอยู่ในสารสกัดจากสปอร์ของเห็ดหลินจือ (spores of Ganoderma extract) จะทำการตรวจพบสารอัลดีไฮด์เท่านั้นเพราะจากงานวิจัยที่ผ่านมาเสนอว่าไม่พบคีโตนในปฏิกิริยาจากการรีดักชั่น (reduction) ของสารละลายสีน้ำเงินเข้มของทองแดง (II) จะให้ตะกอนสีแดงของ copper oxide ที่ไม่ละลายน้ำ

การเตรียมสารละลาย Fehling

การเตรียมส่วนผสมของสารละลาย A ปริมาณ 15 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาณ 15 มิลลิตร หยดสารละลายผสมดังกล่าวนี้ปริมาณ 2 มิลลิตร แล้วเติมสารสกัดสปอร์หรือสารสกัดเห็ดหลินจือแดงจำนวน 3 หยด อุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 60°C จะสังเกตเห็นผลบวกในการทดลอง คือตัวควบคุมบวกจะเกิดสารแขวนลอยสีเขียวและตะกอนสีแดง ทั้งนี้การทดสอบนี้มีความไวมากพอที่สามารถตรวจพบกลูโคส 1 มก ให้สี (Ávila et al., 2012, 131; Laine et al., 2002, 608)

สารละลาย 2 ชนิด คือ สารละลาย A ของ Fehling ประกอบด้วย $CuSO_4.5H_2O$ 7 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นที่หยด sulfuric acid เจือจางปริมาณ 2 หยด และเติมสารละลาย B ของ Fehling ประกอบด้วย Potassium tartate 35 กรัมและ NaOH 12 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

การวัดปริมาณของ phenol จะศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงของสี โดยการใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน (Lubica et al., 2007) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงเป็น mg ของกรดแกลลิกเทียบเท่าต่อหนึ่งรอบของสารสกัด (mg GAE/L)

การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ในการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะใช้วิธี Dinitrosalicylic Acid Method (Miller, 1959) ที่ได้จากสารละลาย DNS ที่ประกอบด้วย 3,5-Dintrosalicylicsacids 1.55 กรัม ฟีนอล 0.15 มิลลิลิตร โซเดียมซัลไฟต์ 0.075 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรท 30 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.9 กรัมในปริมาตรรวมที่มีน้ำ 150 มิลลิลิตร ที่เก็บสารละลายในขวดสีชา โดยการใช้สารละลายมาตรฐานของปฏิกิริยาที่นำ 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายของน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 1 มิลิลิตร มิลลิลิตร แทน) แล้วเติมสารละลาย DNS (3-5 Dinitrosalicylic acid) reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่

ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร การวิเคราะห์ตัวอย่างนำ culture broth ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสของสารสกัดสปอร์และดอกเห็ดหลินจือแดง 0.5 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยในหลอดทดลองมาละลายใน citrate buffer ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จาก**ตารางที่ 3.1**

ตารางที่ 3.1 ความสามารถในการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี spectrophotometry

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm
0	0
0.2	0.004
0.4	0.009
0.4	0.009
0.6	0.018
0.8	0.052
1.0	0.079
2.0	0.213
3.0	0.397
4.0	0.542
5.0	0.648
6.0	0.808
7.0	0.918

ข. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds, TPC)

ปริมาณTPC ของสารสกัดสปอร์และจากดอกเห็ดหลินจือแดงสามารถวัดจากการดูดกลืนของแสง โดยใช้น้ำยา Folin-Ciocalteu (Wang et al., 2005) โดยการนำสารสกัด 500 µL (1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร), น้ำยา Folin-Ciocalteu 500 µL และ20% (wt/v) Na_2CO_3 1.5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น หลังจากการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง นำมาวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการดูดกลืนของแสงของตัวอย่างที่ 765 นาโนเมตร เทียบปริมาณของ TPC กับกรดแกลลิกที่ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

ค. การวิเคราะห์หาปริมาณสารtriterpenoids ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณ triterpenoids ทั้งหมดจากสารสกัดสปอร์หรือดอกเห็ดตามวิธี colorimetric ของ Smina et al (2554) โดยโดยมีการปรับขั้นตอน แทนที่การเติมของสารสกัดของสปอร์ตัวอย่างทดสอบหรือสารละลายมาตรฐานของ ursolic acid ถูกทำให้ระเหยจนแห้งในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 100°C แล้วนำหลอดมาเติม 5% vanillin ใน glacial acetic acid (w/v) ปริมาณ 0.4 มิลิลิตร และperchloric acid ปริมาณ 1.0 มิลิลิตร แต่ได้ นำส่วนผสมของตัวอย่างสปอร์หรือดอกเห็ดหลินจือแดงปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร), 5% vanillin ใน glacial acetic acid (w/v) ปริมาณ 0.4 มิลิลิตร และ ผสมสารละลายกรดเปอร์คลอริกปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 45 นาที แล้วทำให้เกิดปฏิกิริยาโดยการบ่มในอ่างน้ำทีอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเติม glacial acetic acid ปริมาณ 5.0 มิลิลิตร แล้วปล่อยให้เย็นตัวลงก่อนการวัดดูดกลืนของแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-Vis ที่ 548 นาโน

ง. การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือ

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือที่แตกสามารถศึกษาได้ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1) การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

ในการความสามารถในการรีดิวซ์หรือการต้านอนุมูลอิสระ (CUPRAC) ของสารสกัดจากสปอร์ของเห็ดหลินจือแดง ได้ทำตามวิธีการของ Apak et al [21] เริ่มด้วยการนำส่วนผสม Cu(II) (10^{-2} M) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสาระลาย neocuproine (7.5 X 10^{-3} M) ในสารละลายบัฟเฟอร์ CH_3COONH_4 (1 M) ผสมกับสารสกัดจากเห็ดที่เตรียมสดใหม่ที่มีความเข้มข้นต่างกันจะถูกเพิ่มเข้าไปเพื่อให้ปริมาตรสุดท้ายคือ 4 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ทำการวัดการดูดกลืนของแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยการเทียบกับสารละลายเปล่า ผลของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากการดูดกลืนของแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิกที่เป็นตัวควบคุมให้ผลบวก

2) การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบวัดโดย 1-1-Diphemy1-2picryl-hydrazyl

(DPPH) ตามวิธีการของ Blois (1958) สาร DPPH ให้ความสะดวกและแม่นยำโดยอาศัยหลักการ คือ การไตเตรทกลุ่มที่ออกซิไดซ์จากธรรมชาติหรือสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เริ่มต้นด้วยการเตรียม 0.1 mM DPPH ใน methonal ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารสกัดสปอร์ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่ความร้อนสูง 70-100°C exopolysaccharides ประมาณ 3 มิลิลิตร หยาบที่ความเข้มข้นต่างกัน (50, 100, 250, 500 และ 1,000 µg) หลังจากผ่านไป 10 นาที อ่านค่าการดูดซับที่ 517 นาโนเมเตร เปอร์เซ็นต์การไล่ ค่ากิจกรรมคำนวณได้ดังนี้

ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ = (A°- A1) / A°× 100

A° - การดูดซับการควบคุม A1 – การดูดซับของตัวอย่าง

3.3. การผสมสารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงในสบู่

การเตรียมสบู่ก้อนและสบู่เหลว

การทำสบู่ด้วยกระบวนการปฏิกิริยา **saponification** ที่เป็นการ **neutralization fatty acid** และ alkai ให้เกิด soap สบู่และ glycerol เป็นปฏิกิริยาการสลายตัวพื้นฐานสำหรับการผลิตสบู่คือปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันและด่างที่เป็นกลางในการสร้างสบู่และกลีเซอรอล เริ่มด้วยการใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นไขมันที่เป็นกลางและน้ำด่างเป็นด่างแล้วเกิดปฏิกิริยา saponification ขั้นพื้นฐานดังนี้คือ กรดไขมันหรือน้ำมัน (น้ำมันมะพร้าว) 10.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และบีกเกอร์อีกใบใส่เอทานอล 12.5 มิลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน deionized water ปริมาณ 12.5 มิลิลิตรแล้วเติมเม็ดอัลคาไล (NaOH) 3.5 กรัมและกวนจนละลายหมด จากนั้นจึงเติมสารละลายที่สองนี้ลงในบีกเกอร์แรกที่มีน้ำมันมะพร้าว หลังจากนั้นกวนต่อไปบนเตาร้อนที่ตั้งไฟปานกลาง / ต่ำแล้วกวนนานประมาณ 20-30 นาทีจนกลิ่นไขมันหรือน้ำมันหายไป และน้ำมันละลายกลายเป็นสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน ปล่อยให้ส่วนผสมเย็นลงจากนั้นจึงกรองสบู่โดยใช้Buchner funnel และ Whatmann No.1 filter paper แล้วจึงล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 300 มิลิลิตร เพื่อให้เกลือขจัดสิ่งสกปรก จากนั้นทำการล้างด้วยกรดโดยการผ่านกรดเกลือ HCl เจือจาง 0.1 N ปริมาณ 5 มิลิลิตร แล้วปล่อยให้สบู่แข็งตัวอย่างน้อยชั่วโมง ในกรณีต้องการเตรียมสบู่เหลวจะเปลี่ยนจากการใส่ NaOH เป็น KOH แทน

การเตรียมสบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

การเตรียมสบู่สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดง ได้ทำตามวิธีการของ Ruckmani et al. (2014) โดยนำสบู่ที่แข็งตัวหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก แล้วแช่ให้ละลายในอ่างน้ำร้อนเติมสารละลายสารสกัดจากสปอร์และเห็ดหลินจือแดง ที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำปริมาณ 5 มิลิลิตร เติม steric acid ปริมาณ 0.033 กรัมที่ละลายในน้ำร้อนแล้วเติมลงในสบู่ที่หลอมเหลวแล้ว เติม TiO2 ปริมาณ 0.033 กรัมลงใน glycerine ที่หลอมเหลวแล้ว แล้วกวนก่อนการเติมน้ำมันหอมระเหยปริมาณ 2 มิลิลิตร แล้วกวนให้เข้ากัน แล้วหยดด้วยสารละลาย sodium lauryl sulfate ปริมาณ 1 กรัมที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 5 มิลิลิตร แล้วทำการกวนต่อไปนาน 30 นาทีก่อนการเทลงในmold แล้วปล่อยให้แข็งตัว

3.4 การถ่ายทอดการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ให้ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน

ในการถ่ายทอดการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์ชนิดสบู่ก้อนและเหลว และครีมบำรุงผิวให้ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน โดยได้ทำการสาทิตทำการทำโดยผ่านการนำเสนอออนไลน์ให้ชุมชนฟาร?มเห็ดกลางบ้านได้ไฟล์ไปเรียนรู้การทำ โดยสามารถดูย้อนหลังการทำและติดต่อสอบถามขั้นตอนการทำเองได้

การถ่ายทอดการผสมสูตรผสมของสารสำคัญอื่นๆ และสารสกัดจากสปอร์และเห็ดหลินจือแดง

ได้ทำการเตรียมสบู่สารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง ใช้อุปกรณ์ดังแสดงตัวอย่างใน**ภาพที่ 3.1** และเตรียมสบู่ โดยสามารถสังเกตสีและลักษณะเมื่อทำการเติมสารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง เกิดสีเข้มขึ้นดัง**ภาพที่ 3.1** และ **3.2**

ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสบู่จากสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

ภาพที่ 3.2 ระหว่างการเตรียมสบู่ด้วยกระบวนการ saponification

ภาพที่ 3.3 การเตรียมสบู่ที่มีสารสกัดเติมสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ซ้าย) และสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ขวา)

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการดำเนินงานวิจัยเรื่อง สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี เพื่อใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทีมผู้วิจัยได้ทำการศึกษาขั้นตอนการกะเทาะเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยการใช้วิธี bead beating และการหมักด้วยจุลินทรีย์ แล้วทำการสกัดสารสำคัญ polysaccharides และ triterpenoids red และทำเป็นสารสกัดในสูตรผสมในสบู่ก้อนและเหลว พร้อมทั้งทดสอบความพึงพอใจของผู้ใช้ เพื่อบ่งบอกการยอมรับและการเป็นพิษ แพ้ในมนุษย์เบื้องต้น ซึ่งสามารถสรุปผลการวิจัยได้ดังนี้

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

4.1.1 การกะเทาะเปลือกสปอร์

ในการกะเทาะเปลือกสปอร์เพื่อช่วยในการนำสาระสำคัญออกก่อนกระบวนการสกัดสาร จากการศึกษาพบว่าการกะเทาะเปลือกของสปอร์ออกได้มากเกินกว่าร้อยละ 60 จึงส่งผลต่อปริมาณมากของสารสำคัญ ซึ่งงพบว่าได้มาดจากสปอร์จากเห็ดหลินจือแดง ในปริมาณที่มากกว่าที่พบจากดอกเห็ดหลินจือแดง ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Min et al., 2000) ซึ่งพบว่าจำเป็นต้องมีกระบวนการกะเทาะสาสำคัญออกจากสปอร์ การกะเทาะเปลือก ด้วยวิธี sonication พบว่าได้ต่ำตามวิธีของงานวิจัยที่ผ่านมา ให้ปริมาณของสปอร์ที่แตกหักไม่เกิน 20-30% (จากการสังเกตในห้องปฏิบัติการ) ไม่แตกต่างจากวิธีที่ทีมนักวิจัยได้ทดลองเลือกมา

การแตกหักของเปลือกสปอร์ ด้วยวิธีการ bead beating และการหมักด้วยจุลินทรีย์ แสดงลักษณะของสปอร์ด้วยการวัดค่าความขุ่นดัง**ตารางที่ 4.1-4.2**

ตารางที่ 4.1 ผลการกะเทาะสปอร์ด้วยวิธีการ freezing bead beating และการหมักด้วยจุลินทรีย์

Aqueous extract of *G. lucidum* (mg/mL)	Absorbance at 450 nm
0.10	0.17 $\pm$ 0.02
0.25	0.32 $\pm$0.01
0.50	0.83 $\pm$ 0.03
0.75	1.12 $\pm$ 0.02
1.00	1.51 $\pm$ 0.07
Ascorbic acid (5 x 10^{-3} g/mL)	2.00 $\pm$ 0.01

จากการวิจัยพบว่า การหมัก spore ด้วยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในระยะเวลานาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว bead beating 5 นาที โดยหยุดทุก 90 วินาที พัก 30 วินาที ช่วยให้เปลือกของ spore *Ganoderma lucidum* มีการย่อยสลายได้ดี

ตารางที่ 4.2 ระยะการหมักสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วย Lactobacilli หลังการ freezing bead beating

Spore Ganoderma	**สภาวะการตกตะกอนหมดจนใส**
การใช้ bead beating 15 นาที หลังการแช่แข็งที่ -20°C	15 นาที
การใช้ *Lactobacillus* spp. หมักนาน 12 ชม RT แล้ว bead beating 5 นาที	3 hr
การใช้ *Lactobacillus* spp. หมักนาน 24 ชม RT แล้ว bead beating 5 นาที	1.5 hr

เนื่องจากสารที่ได้หลังจากการ break จำเป็นต้องส่องกล้องจุลทรรศน์ และทำการตรวจสอบดูปริมาณสาร Polysaccharide ที่ได้ ต่อไป

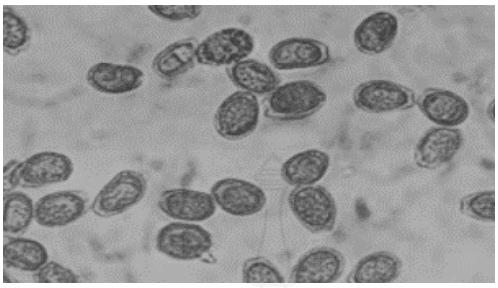
4.1.2 การหมักด้วย *Lactobacillus* spp.

การกะเทาะหรือย่อยสลายเปลือกสปอร์เห็ดหลินจือแดงด้วยการช่วยของ *Lactobacillus* spp. พบว่าเมื่อใช้แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^9 Cells/mL หมัก *Ganoderma lucidum* spore จำนวน 600 grams เวลานาน 5-7 days แล้วต่อมาพบว่าการหมักด้วยแบคทีเรียนี้สามารถลดเวลาลงเหลือ 24 ชั่วโมง เนื่องจากให้ปริมาณของสปอร์ที่แตกไม่แตกต่าง (ภาพที่ 4.1-4.2) โดยสังเกตเห็น spore มีลักษณะบวมแล้วค่อยแตก จากภาพการแตกของสปอร์ที่จากกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 10 X (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) เมื่อทำการสกัดหยาบด้วย 80% (v/v) เอทิลแอลกอฮอล์ ที่ RT เพื่อกำจัดสารที่ปนเปื้อนขนาดเล็กออกและนำตะกอนมาสกัดต่อด้วยน้ำร้อนที่ 100°C 4 hr. จำนวน 6 ครั้ง ทั้งนี้พบว่ามีปริมาณของสารสำคัญ เช่น polysaccharides ที่มากขึ้นด้วย (ภาพที่ 4.4)

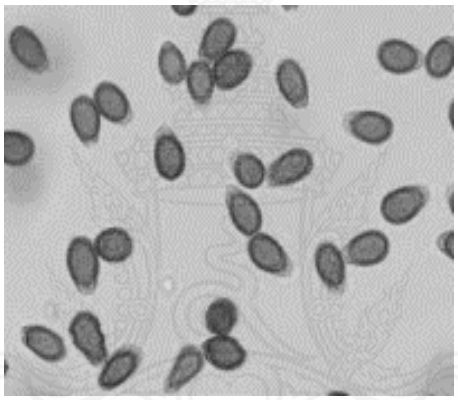
จากการวิจัยพบว่า การหมัก spore ด้วยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในระยะเวลานาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว bead beating 5 นาที โดยหยุดทุก 90 วินาที พัก 30 วินาที ช่วยให้เปลือกของ spore *Ganoderma lucidum* (ภาพที่ 1) มีการย่อยสลายได้ดีกว่าวิธีการใช้ bead beating อย่างเดียว เมื่อนำส่วนสปอร์ที่ไม่แตกดีมาปั่น centrifugation ที่ 8,000 rpm 25 min เฉพาะส่วนสารละลายที่ได้มีส่วนองค์ประกอบหลากหลาย ดังนี้คือ

1. มี Polysaccharides และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวประเภท reducing sugar จากการทำการตรวจสอบด้วย Benedict test ให้ปริมาณสูงมากกว่า 8-9% (g/g) (ภาพที 4.4)

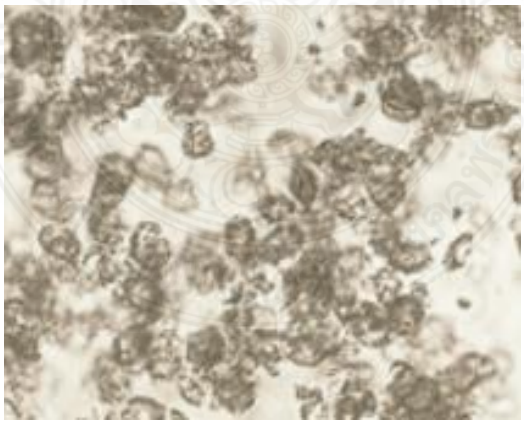
2. โปรตีน ในปริมาณมากกว่า 300 mg/mLของสารละลายที่สกัดได้ เพื่อทำการกำจัดโปรตีนที่อาจปนเปื้อนมากับน้ำตาล จึงทำการตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) แล้วทำการ dialysis ด้วยสารละลาย 1 M NaOH เพื่อ neutralization TCA ออกไป แล้วตามด้วยการ dialysis ด้วยน้ำเปล่าที่ไหลผ่านเปลี่ยนบ่อยๆ เป็นเวลานาน 2 days



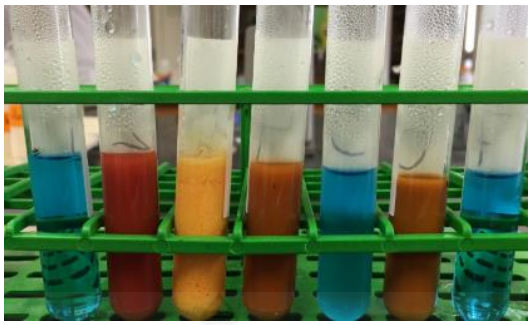
ภาพที่ 4.1 สปอร์ของ *Ganoderma lucidum* ก่อนการทำให้แตก



ภาพที่ 4.2 สปอร์ของ *Ganoderma lucidum* ที่ผ่านการหมักด้วย *Lactobacillus* spore มีลักษณะบวมใกล้จะแตก



ภาพที่ 4.3 sporeของเห็ดหลินจือแดงที่ผ่านการสกัดด้วยการหมัก



ภาพที่ 4.4 ผลการวัดปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี Benedict testที่ได้จากสารละลาย ดังแสดงผลบวกด้วยการเกิดสีส้ม เหลือง ตะกอนแดงอิฐ ในหลอดที่ 2 3 4 และ 6 เมื่อวัดการดูดกลืนของแสงที่ 625 nm.

ดังนั้นในการศึกษานี้ได้เลือกใช้การหมัก spore ด้วยเชื้อ Lactobacillus spp. ในระยะเวลานาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการ freezing และ bead beating เนื่องจากสารที่ได้หลังจากการ break จำเป็นต้องส่องกล้องจุลทรรศน์ และทำการตรวจสอบดูปริมาณสาร Polysaccharide ที่ได้มาก

4.2. สารสำคัญจากสปอร์และเห็ดหลินจือแดง

นอกจากนี้ ส่วนต่างๆของเห็ดหลินจือแดงให้ปริมาณของสารสกัดสำคัญ คือ polysaccharides (**ตารางที่ 4.3**) และ triterpenoid (**ตารางที่ 4.4**) ที่แตกต่างกัน โดยพบสารสำคัญทั้งสองชนิดจากสปอร์ในปริมาณที่สูงสุด

ตารางที่ 4.3 Total contents of polysaccharides in different parts of Lingzhi parts: Spores and fruiting body

Lingzhi parts	% Total polysaccharides
FFB-SF	2.65±0.39
DFB-ER	3.02±.55
BP-ER	4.91± 0.87
BP-SF	4.06± 0.31
BP-SFLF	4.23±1.12

หมายเหตุ: FFB = Fresh fruiting body, DFB = Dried fruiting body, BP = Broken spores, SF = sonication and freezing, SFLF = sonication and *Lactobacillus* fermentation, ER = Enzymatic reaction of cellulase (*Aspergillus niger*)

ตารางที่ 4.4 Total contents of triterpenoids in different parts of Lingzhi parts: Spores and fruiting body

Lingzhi parts	**% Total triterpenoid**
FFB-SF	0.07±0.004
DFB-ER	0.12± 0.003
BP-ER	0.24± 0.08
BP-SF	0.31±0.05
BP-SFLF	0.33±0.78
Commercial BP	0.26± 0.03

หมายเหตุ: FFB = Fresh fruiting body, DFB = Dried fruiting body, BP = Broken spores, SF = sonication and freezing , SFLF = sonication and *Lactobacillus* fermentation, ER = Enzymatic reaction of cellulase (*Aspergillus niger*)

การทำให้ spore แตกหักด้วยวิธีการ Bead beating and Freezing ไม่ให้ผลที่แตกต่างจากวิธีการใช้ enzyme cellulase ที่ทำการแช่ที่ 40oC เป็นเวลานาน 30 นาที 1 ชั่วโมง แต่พบว่าจะดียิ่งขึ้นเมื่อทำการหมักด้วยการใช้กรด Lactic acid จากเชื้อ Lactic acid bacteria ที่คัดแยกได้จากการหมัก Kefir (คัดแยกกลุ่มเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ในห้องปฏิบัติการ) พบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการสกัดได้ยิ่งขึ้น และทำให้ได้สาระสำคัญมากขึ้น ทั้งนี้ได้เทียบกับตัวควบคุมจาก Commerical broken spore ที่ขายในตลาดปัจจุบัน

ด้วยวิธีการหมัก spore ด้วยเชื้อ Lactobacillus spp. ในระยะเวลานาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการทำ bead beating 5 นาทีแล้ว freezing (BP-SFLF) หรือไม่ใช้ freezing (ผลเบื้องต้นจากห้องปฏิบัติการ) ช่วยให้เปลือกของ spore Ganoderma lucidum มีการย่อยสลายได้ดี และสามารถปล่อยสารสำคัญออกมาได้ในปริมาณสูงกว่าวิธีอื่น ๆ ตารางที่ 1 2 และ 3) ซึ่งจากการทดสอบคือ triterpenes และ polysaccharide เมื่อทำการเรียงวิธีการย่อยเปลือกของ spore Ganoderma พบว่า ประสิทธิภาพของวิธีจากดีสุดไปน้อยสุด จากการวิจัยนี้ คือ BP-SFLF > BP-ER และ BP-SF

การเพิ่มวิธีการ freezing ที่ -20°C เป็นเวลานาน 2 วัน แล้วบดด้วย bead milling แบบเดิมแล้วแต่ไม่มีการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacilli* species ที่ได้คัดแยกในห้องปฏิบัติการ พบว่าช่วยเร่งการ

ย่อยสลายเปลือกสปอร์ มากขึ้นเป็นร้อยละ 40-45 แต่เมื่อทำต่อด้วยการบ่มสารสกัดเชื้อ Lactobacilli กับสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient broth ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถทำให้การสกัดสารสำคัญมีศักยภาพในการทำให้เซลล์สปอร์แตกในปริมาณสูงขึ้น คือมากกว่า 65-80% ทั้งนี้ขึ้นกับประสิทธิภาพการ freezing และประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย การแตกของเปลือกสปอร์ที่มากขึ้นจะทำให้ได้สารสกัดที่มากขึ้น ทั้งนี้สารสำคัญได้มาจากการทำการสกัดสารสำคัญด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 20:80 ซึ่งเป็นวิธีการเดียวกับที่ใช้กับการสกัดดอกเห็ดหลินจือแดงตามวิธีการสกัดสารสำคัญทั่วไป

ความสำคัญของการหมักด้วยเชื้อ Lactobacilli คือการช่วยย่อยสปอร์ได้ดีขึ้น ด้วยสปอร์เห็ดหลินจือแดงมีสารประเภทไคตินโมเลกุลสูง ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ อยู่ร้อยละ 52.08-54.68 (Jungjing et al., 2007) และไม่สามารถถูกย่อยสลายในระบบการย่อยในกระเพาะของมนุษย์ และยากต่อการทำลายโดยวิธีทั่วไปของการต้มบดที่ไม่ใช้อุณหภูมิสูง การเลือกวิธีการย่อยสลายไคตินด้วยจุลินทรีย์จึงเหมาะสม สปอร์สามารถถูกย่อยสลายโดยกลุ่มจุลินทรีย์แบบ symbiotic microbes ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *L. plantarum* chitinase มีความสามารถในการย่อยสลายไคตินจากเชื้อรา (Brurberg et al., 1994) ด้วยความสามารถในการทำงานภายใต้สภาวะไม่ใช้ออกซิเจน จะสามารถช่วยย่อยไคตินและองค์ประกอบของเปลือกสปอร์ได้ จากงานวิจัยของ Nguyen Minh and Nguyen Thi My Tuyen (2015) ได้พบว่า ภายใน 24 ชั่วโมงของการหมัก อัตราการแตกของผนังเซลล์ของสปอร์เพิ่มมากขึ้นจากร้อยละ 38 เป็นร้อยละ 50 และเพิ่มมากขึ้นอีกเล็กน้อยหลังจากการหมักนาน 72 ชั่วโมง ซึ่งในการศึกษาได้เลือกการหมักด้วยเชื้อ Lactobacilli เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยการจำกัดสารอาหารไม่เพียงพอ ทำให้เชื้อแบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต จึงส่งผลให้หมดประสิทธิภาพของกลุ่มเอนไซม์ chitinase ดังนั้นในการพัฒนาประสิทธิภาพในการทำให้เปลือกสปอร์แตกมากขึ้นจำเป็นต้องช่วยด้วยการใช้วิธีการหมักด้วย *Lactobacillus* spp. แต่การเลือกการหมักด้วยวิธีอาจเป็นไปได้ แต่จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อไป เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการหมักเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดชนิด polysaccharide และ triterphenoid มากขึ้น (Sood et al., 2013) และจำเป็นต้องมีการเพิ่มแหล่งอาหารระหว่างกระบวนการหมักหากต้องการให้นานมากกว่า 24 ชั่วโมง

4.3 ผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

การเตรียมสบู่สารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง ใช้อุปกรณ์ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ และ เตรียมสบู่ โดยสามารถสังเกตสีและลักษณะเมื่อทำการเติมสารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง เกิดสีเข้มขึ้นดังภาพที่ 4.5 และ 4.6

ภาพที่ 4.5 การเติมสารสกัดสปอร์ในกระบวนการเตรียมสบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง

ภาพที่ 4.6 การเตรียมสบู่ที่มีสารสกัดเติมสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ซ้าย) และสารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง (ขวา)

ภาพที่ 4.7 การเตรียมส่วนผสมเพื่อการสกัดเหล็ดหลินจือในส่วนผสมน้ำ-เอทานอล และน้ำมันมะพร้าวโดยชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี

ภาพที่ 4.8 ตัวอย่างการเตรียมสารสกัดเห็ดหลินจือแดงเพื่อทำสบู่ก้อนและสบู่เหลว

4.4 ความพึงพอใจและคุณสมบัติของสบู่สารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง

ด้วยความพึงพอใจของสบู่สารสกัดสปอร์และเห็ดหลินจือแดง หลังจากการใช้ มีผลการศึกษาตัวแปรของการมีและไม่มีสารชนิดสารสกัดเห็ดหลินจือแดง ดังแสดงต่อไปนี้

พบว่าไม่มีความแตกต่างของความชุ่มชื้นของผิวหน้าของผู้ทดสอบจากสบู่ที่มีสารสกัดเห็ดหลินจือแดง และที่ไม่มีสารสกัดดังกล่าว ดัง**ตารางที่ 4.5**

ตารางที่ 4.5 การทดสอบคุณลักษณะขอความชุ่มชื้นของผิวหน้าของผู้ทดสอบ หลังจากการใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง

สูตร	ผิวชุ่มชื้น	คิดเป็นร้อยละ	ผิวไม่มีความชุ่มชื้น	คิดเป็นร้อยละ
สบู่ที่มีสารสกัด	35	87.50	5	2.50
สบู่ที่ไม่มีสารสกัด	25	62.50	15	37.50

จากการทดสอบคุณลักษณะของผิวหน้าของผู้ทีทดสอบ ได้ใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง พบว่าผู้ทดสอบจากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง มีความรู้สึกถึงผิวกระจ่างใสของผิวหน้าได้ 80% เมื่อเปรียบเทียบกับสบู่ที่ไม่มีสารสกัดดังกล่าว ที่ 15% **ดังตารางที่ 4.6**

ตารางที่ 4.6 การทดสอบคุณลักษณะของผิวหน้าของผู้ทีทดสอบ หลังจากการใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง

สูตร	**ผิวมีความกระจ่างใส**	**คิดเป็นร้อยละ**	**ผิวไม่มีความกระจ่างใส**	**คิดเป็นร้อยละ**
สบู่ที่มีสารสกัด	32	80	8	20
สบู่ที่ไม่มีสารสกัด	15	37.50	15	63.50

จากการทดสอบคุณลักษณะการทดสอบคุณลักษณะการสัมผัสจากผู้ทีทดสอบ ได้ใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง พบว่าไม่มีความแตกต่างของเนื้อครีมระหว่างที่มีการเติมหรือไม่เติมสารสกัด โดยพบว่ามีเนื้อเนียน กลิ่นไม่แตกต่างกัน **ดังตารางที่ 4.7**

ตารางที่ 4.7 การทดสอบคุณลักษณะการสัมผัสจากผู้ทีทดสอบ ได้ใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง

สูตร	**ชอบเนื้อเนียนชอบกลิ่น**	**คิดเป็นร้อยละ**	**ไม่ชอบเนื้อเนียนไม่ชอบกลิ่น**	**คิดเป็นร้อยละ**
สบู่ที่มีสารสกัด	34	85	6	15
สบู่ที่ไม่มีสารสกัด	36	90	4	10

จากการทดสอบคุณลักษณะการทดสอบคุณลักษณะของความระคายเคืองและการแพ้จากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง เมื่อได้ใช้สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง พบว่าไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง และไม่แพ้ เมื่อเทียบกับครีมทาผิวตัวควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสกัด ดัง**ตารางที่ 4.8** และ **4.9**

ตารางที่ 4.8 การทดสอบคุณลักษณะของความระคายเคืองจากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง

สูตร	ผิวระคายเคือง	คิดเป็นร้อยละ	ผิวไม่ระคายเคือง	คิดเป็นร้อยละ
สบู่ที่มีสารสกัด	0	0	40	100
สบู่ที่ไม่มีสารสกัด	0	0	40	100

ตารางที่ 4.9 การทดสอบคุณลักษณะการแพ้จากสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง

สูตร	อาการแพ้	คิดเป็นร้อยละ	ไม่มีอาการแพ้	คิดเป็นร้อยละ
สบู่ที่มีสารสกัด	0	0	40	100
สบู่ที่ไม่มีสารสกัด	0	0	40	100

จากการศึกษาตัวแปรของสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดง ต่าง ๆ สามารถสรุปได้ คือ สบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดงมีคุณสมบัติ ส่วนใหญ่ทำให้ชุ่มชื้น ผิวกระจ่างใส เนื้อเนียน สีกลิ่นถูกใจ ไม่มีความระคายเคือง และไม่ก่อให้เกิดการแพ้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง สารสกัดจากสปอร์เห็ดหลินจือแดงจากวิสาหกิจชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี สามารถสรุปได้ดังนี้

งานการวิจัยนี้เป็นการพัฒนากระบวนการกะเทาะ สกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดงที่พบว่ามีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มาจากสาระสำคัญหลักที่ทดสอบได้คือ สาร polysaccharides และ triterpenoids ทั้งนี้กระบวนการกะเทาะสปอร์ที่ได้มีการทำในปัจจุบันที่ยุ่งยาก และมีปริมาณไม่มาก ไม่เกินร้อยละ 50-60 ด้วยการพัฒนาของการศึกษานี้ได้พบขั้นตอนที่เหมาะในการทำการกะเทาะสปอร์และสกัดสาระสำคัญ โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

1. การ Freezing -20oC เป็นเวลานาน 2 วัน แล้วทำการ bead beating เป็นเวลานาน 5 นาทีเหมัก spore ด้วยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในระยะเวลานาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง
2. การทำ bead beating เป็นเวลานาน 5 นาที โดยหยุดทุก 90 วินาที พัก 30 วินาที เพื่อช่วยให้เปลือกของ spore *Ganoderma lucidum* และต่อด้วยการย่อยสลายได้ดีกว่าวิธีการใช้ beat beating อย่างเดียว
3. นำสารผสมดังกล่าวที่มีทั้งส่วนที่กะเทาะและไม่กะเทาะ มาผ่านกระบวนการหมักด้วย *Lactobacillus* spp. ที่ได้จากในห้องปฏิบัติการ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการแยกส่วนที่แตกแล้วออกสปอร์ที่ไม่แตกดีมาปั่น centrifugation ที่ 8,000 rpm 25 min เฉพาะส่วนสารละลายที่ได้มีส่วนองค์ประกอบหลากหลาย ดังนี้คือ
    - 3.1.1 มี Polysaccharides และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี Benedict test ที่อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยา Complex ของ Fehling test และการเกิด Cu(II) กับ reducing sugar
    - 3.1.2 มี triterpenoids ด้วยวิธี colorimetric method ด้วยการทำปฏิกิริยากับ glacial acetic acid และ perchloric acid

ด้วยกระบวนการดังกล่าวทำให้อัตราการแตกของผนังเซลล์ของสปอร์เพิ่มมากขึ้นจากร้อยละ 38 เป็นมากกว่าร้อยละ 60 เมื่อทำการสกัดสารสำคัญจากสปอร์และดอกเหล็ดหลินจือในส่วนผสมน้ำ-เอทานอลที่อัตราส่วน 20 : 80 แล้วนำไปเป็นส่วนผสมของสบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดง ทั้งสบู่ก้อนและสบู่เหลว และเมื่อถ่ายทอดให้แก่ชุมชนฟาร์มเห็ดกลางบ้าน จังหวัดปทุมธานี ชุมชนดังกล่าวสามารถเรียนรู้กระบวนการกะเทาะ การสกัด และการทำสบู่ก้อนและสบู่เหลวเองได้ในชุมชน และยังพบว่าผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์เห็ดหลินจือแดงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยจากการสอบถามด้วยแบบสอบถามพบว่าส่วนใหญ่ทำให้ชุ่มชื้น ผิวกระจ่างใส เนื้อเนียน สีกลิ่นถูกใจ ไม่มีความระคายเคือง และไม่ก่อให้เกิดการแพ้ไม่ก่ออาการแพ้ ไม่ระคายเคือง ไม่ทำให้ผิวแห้ง

ดังนั้นงานที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สบู่สารสกัดสปอร์ที่มีสารสำคัญของเห็ดหลินจือแดงในปริมาณที่สูง สามารถทำการแปรรูปในรูปของสบู่สารสกัดเห็ดหลินจือแดงในทางการค้าได้ และจะเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไป

บรรณานุกรม

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and S. E. Karademir. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 52(26):7970–7981.

Arnao, M. B., Cano, A. and M. Acosta. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry 73(2): 239-344.

Bhat, Z. A. B., Wani A. H., Bhat M. Y., and A. R. Malik. Major Bioactive Triterpenoids from Ganoderma species and Their Therapeutic Activity: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol. 12, no. 4, Mar. 2019, pp. 22-30, doi:10.22159/ajpcr.2019.v12i4.32124.

Castaneda A., M. Dolores et al., 2018. Detection of polysaccharides in *Ganoderma lucidum* extracts. Nova scientia [online], 10(21):.247-257.

Cör, D., Botić, T., Knez, Ž., Gregori, A., and F. Pohleven. 2017. The effects of different solvents on bioactive metabolites and "in vitro" antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of *Ganoderma lucidum* fruiting body and primordia extracts. Macedonian. Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 36(1):1-13. doi:10.20450/mjcce.2017.1054.

Chaiyasut, C., Kruatama, C., Sirilun, S., 2010. Breaking the spores of Ganoderma lucidum by fermentation with Lactobacillus plantarum. African Journal of Biotechnology. 9 (43): 7379-7382.

Chen, R. Y., and D. Q. Yu. 1993. Studies on the triterpenoid constituents of the spores from Ganoderma lucidum Karst. J Chin Pharm Sci. 2:91-6.

Cör D, Knez Ž, Knez, H., M. 2018. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of Ganoderma lucidum terpenoids and polysaccharides: A Review. Molecules. 23:649.

Fukuzawa, M., Yamaguchi, R., Hide, I., Chen, Z., Hirai,Y., Sugimoto, A,. et al. 2008. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of Ganoderma lucidum (*Reishi houshi*) to its anti-tumor activity. Biol Pharm Bull., 31:1933-7.

Gao, P., Hirano, T., Chen, Z., Yasuhara, T., Nakata, Y., Sugimoto, A., et al. 2012. Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of Ganoderma lucidum (reishi mushroom). Fitoterapia, 83:490-9.

Jungjing, M.A., Zhengyi, F.U., Peiyan, M.A., Yanli, S.U., Qingjie, Z., 2007. Breaking and characteristics of Ganoderma lucidum spores by high speed centrifugal shearing pulverizer. J. Wuhan Univ. TechMater. 22: 617-621.

Liu J, Kurashiki K, Fukuta A, Kaneko S, Suimi Y, Shimizu K, et al. 2012. Quantitative determination of the representative triterpenoids in the extracts of Ganoderma lucidum with different growth stages using high-performance liquid chromatography for evaluation of their 5'-reductase inhibitory properties. Food chem., 133:1034-38.

Liu, X., Yuan J. P., Chung, C. K., Chen, X. J. 2002. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of Ganoderma lucidum. Cancer Lett. 182: 155-161.

Ma, B. J., Zhou, Y., Ruan, Y., Ma, J. C., Ren, W., and C. N. 2012. Lanostane-type triterpenes from the sporoderm-broken spores of Ganoderma lucidum. J Antibiot., 65:165-7.

Lubica, L., Jan, M., Irena, M., Daniel, G., 2007. Antioxidant activity and total phenols in different extracts of Staphylea species. Molecule. 12: 98-102.

Min, B. S., Gao, J. J., Nakamura, N., M. Hattori. 2000. Triterpenes from the spores of Ganoderma lucidum and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. Chem Pharm Bull (Tokyo), 48:1026-33.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44: 307–315.

Park, E. J., Ko, G., Kim, J., Sohn, D. H. 1997. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from Ganoderma lucidum, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced by biliary obstruction. Biol Pharm Bull., 20:417-20.

Pai-Feng, K., Shwu-Huey, W., Wei-Ting, H., Yu-Han, L., Chun-Mao, L., Wen-Bin, Y. 2012. Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1,3-Glucan from the Residue of Extracted Ganoderma lucidum Fruiting Bodies. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1-8. doi:10.1155/2012/673764.

Pillai, T.G., Nair C. K. K., Janardhanan, K. K. 2008. Polysaccharides isolated from Ganoderma lucidum occurring in southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo. Environ Toxicol Pharmacol., 26(1):80-85. http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.02.004

Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., and M. Iacomini. 2015. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification, and chemical characterization approaches. Carbohydrate Polymers, 117:753-761. doi: 10.1016/j. carbpol.2014.10.051.

Skalicka-Woźniak, K., Szypowski, J., Łoś, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Głowniak, K., Malm, A. 2020. Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 89(2):17-22. https://doi.org/10.5586/asbp.2012.001

Sood, G., Sharma, S., Kapoor, S., Khanna, P.K., 2013. Optimization of extraction and characterization of polysaccharides from medicinal mushroom Ganoderma lucidum using response surface methodology. Journal of Medicinal Plants Reseach. 7(31): 2323-2329.

Ramakrishna G, Prasad N. B. L., Azeemoddin, G. 2004. Cold processing neem seed, JNTU, Oil Technological Research Institute, Proceedings of the World Neem Conference, Bangalore, India. 24 – 28.

Ruckmani, K., Krishnamoorthy, R., Samuel, S., H. Linda Jeeva Kumari. 2014. Formulation of Herbal Bath Soap from Vitex negundo Leaf Extract. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. Special Issue 2: October 2014: 95-99.

Wang, B. J., Liu, C. T., Tseng, C. Y., and Z. R. Yu. 2005. Antioxidant activity of Bupleurum kaoi Liu (Chao et Chuang) fractions fractionated by supercritical CO_2. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie - Food Science and Technology 38(3): 281-287.

Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol., 60:258-74.

Wu G, Qian Z, Guo J, Hu D, Bao J, Xie J, et al. Ganoderma lucidum extract induces G1 cell cycle arrest, and apoptosis in human breast cancer cells. Am J Chin Med 2012;40:631-42.

Ye L, Liu S, Xie F, Zhao L, and X. Wu. 2018. Enhanced production of polysaccharides and triterpenoids in Ganoderma lucidum fruit bodies on induction with signal transduction during the fruiting stage. PLoS ONE, 13(4): e0196287.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196287

Yu, Y., Lou, X., Wu, H., 2008. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. Energy & Fuels, 22 (1): 46-60.

Zhou, Y., Qu, Z. Q., Zeng, Y. S., Lin, Y. K., Li, Y., Chung, P., et al. 2012. Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. Exp Toxicol Pathol., 64:673-80.

ไม่มีเนื้อหาจากต้นฉบับ

ไม่มีเนื้อหาจากต้นฉบับ