การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ฤทธิ์เสริมระบบภูมิคุ้มกัน และต้านเซลล์มะเร็งเต้านมจากผงเห็ดแชมปิญอง

งานวิจัยนี้เป็นลิขสิทธิ์ของ บริษัท เซนทอล จำกัด

จังหวัด ลพบุรี ประเทศไทย
พุทธศักราช 2565

บริษัท เซนทอล จำกัด สาขาที่ 0001 เลขที่ 58 หมู่ 1 ต.ดีลัง อ.พัฒนานิคม จ.ลพบุรี

ผู้วิจัย: ดร. ลัดดา แสงเดือน วัฒนศิริธรรม และ ดร. ซาฟียะห์ สะอะ
หน่วยงาน สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม.

คำสำคัญ: เห็ดแชมปิญอง โพลีแซคคาไรด์ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ
ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม

บทคัดย่อ

เห็ดแชมปิญอง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*) เป็นเชื้อราที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีคุณสมบัติทางยา โพลีแซ็คคาไรด์ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของ *A. bisporus* มีฤทธิ์ทางชีววิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน สมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและต้านการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตามสารสำคัญที่พบในเห็ดแชมปิญองจากแต่ละพื้นที่ จะมีปริมาณและคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งปลูก สายพันธุ์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สภาพบรรยากาศ ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว รวมถึงผลจากขบวนการแปรรูปจากเห็ดในรูปเห็ดสดเป็นเห็ดแห้ง จากการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (*in vitro*) สมบัติการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบหรือสารเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านม จากตัวอย่างผงเห็ดแชมปิญอง 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนดอก และขา พบว่า มีความชื้นเท่ากับ 7.45 และ 7.50% ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบเท่ากับ 44.29 และ 30.76% คิดเป็น 3.58 และ 1.71% ของตัวอย่าง ปริมาณ เบต้ากลูแคนเท่ากับ 12.83 และ 15.59% ตามลำดับ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระตรวจในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยตรวจทั้งในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและสกัดด้วยเมทานอล พบว่าในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ และสารสกัดเมทานอลมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยวิธี FRAP ABTS และ ORAC และในสารสกัดจากดอกจะให้ค่าที่สูงกว่าในส่วนขา

ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide (NO)) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบเรื้อรัง โดยทดสอบสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากส่วนดอกและขาของเห็ดแชมปิญองต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ RAW 264.7 ใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 ug/ml สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ดี เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่รับสารสกัด ฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 และ TNF-α เป็น cytokine ซึ่งเป็นสารที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบเป็น proinflammatory cytokines ที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในทุกระยะของสภาวะที่เกิดการอักเสบ การยับยั้ง proinflammatory cytokine ทั้งสองจัดเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญ พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 ug/ml สามารถยับยั้งการหลั่งทั้ง IL-6 และ TNF-α (ทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว สรุปได้ว่า สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขา

ช่วยยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ ไนตริกออกไซด์ IL-6 และ TNF-**α** ได้ ฤทธิ์การยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปเหล่านี้เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ทดสอบโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เทียบกับเซลล์เต้านมปกติ MCF-12A พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นแบบ dose-dependent โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จะสามารถยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งได้เพิ่มขึ้น และพบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1000 ug/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมสูงกว่ายา doxorubicin (ความเข้มข้น 0.29 µg/ml)

ผลการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็น**ถึงความเป็นไปได้**ในการนำสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง ไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร หรืออาหารเสริมหรือใช้ผงเห็ดเป็นอาหาร หรืออาหารเสริม เนื่องจากสารสำคัญในผงเห็ดแชมปิญองมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเซลล์ไลน์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดโพลีแซคคารไรด์ในสัตว์ทดลองและวิจัยทางคลินิคต่อไป เพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจถึงประสิทธิผลในการบริโภค

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) คือสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโดยเฉพาะโรคเรื้อรังที่สัมพันธ์กับอาหาร เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคสมอง เป็นต้น สารอาหารที่มีสมบัติต้านออกซิเดชัน ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (แหล่งกำเนิดของวิตามินเอ) วิตามินซี วิตามินอี สารประกอบฟีโนลิก โปรตีน เปปไทด์ โพลีแซคคาไรด์ และแร่ธาตุต่างๆ เช่น สังกะสี ซิลิเนียมและแมงกานีส

ระบบภูมิคุ้มกัน คือระบบที่คอยปกป้องร่างกายจากเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่อาจเข้ามาทำอันตรายต่อร่างกาย โดยการสร้างเม็ดเลือดขาวขึ้นมาทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ แต่ถ้าระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผิดปกติ อาจส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพหรือเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรังต่างๆได้เช่นกัน เห็ดแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติหรือประโยชน์ต่อภาวะสุขภาพที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของสารสำคัญหลักในนั้น สารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ที่พบในเห็ดจะอยู่ในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ เช่น เบตากลูแคน (beta-glucan) สารในกลุ่มนี้จะมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้ร่างกายสามารถป้องกันหรือทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกกลุ่มหนึ่งคือ สารประกอบฟีโนลิก ซึ่งมีสมบัติต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ โดยในการทดสอบจะทำการกระตุ้น RAW 264.7 cell line ด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) เพื่อให้เซลล์เกิดการอักเสบและทำการทดสอบผลในการยับยั้งการอักเสบของสารสกัดจากเห็ด สารเบตากลูแคนในเห็ดเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulating activity) ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอก (Anti-tumor activity) ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด (Anti-lipidemia activity) ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Anti-diabetes activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammation activity) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Anti-bacterial activity) คุณประโยชน์เหล่านี้จะช่วยส่งเสริมให้ร่างกายแข็งแรง ช่วยป้องกันการเกิดโรคในอนาคต ตัวอย่างการศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การศึกษาของ Maja Kozarski และคณะ (2011) พบว่าสารสกัด beta-glucan จากก้านเห็ด A. *bisporus* และ *A. brasiliensis* และดอกเห็ด *G. lucidum* มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs และกระตุ้นการสร้างสาร IFN-γ (Kozarski, Klaus *et al*., 2011)

เห็ดแชมปิญอง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*) เป็นเชื้อราที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีคุณสมบัติทางยา โพลีแซ็คคาไรด์ เป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดของ *A. bisporus* มีฤทธิ์ทางชีววิทยาที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน สมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและต้านการอักเสบ (Feng, *et al*., 2020) แต่อย่างไรก็ตามสารสำคัญที่พบในเห็ดแชมปิญองจากแต่ละพื้นที่ จะมีปริมาณและคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งปลูก สายพันธุ์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง สภาพบรรยากาศ ระยะเวลาการเก็บ

เกี่ยว รวมถึงผลจากขบวนการแปรรูปจากเห็ดในรูปเห็ดสดเป็นเห็ดแห้ง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบปริมาณสารสำคัญที่พบและฤทธิ์ทางชีวภาพของ *A. bisporus* ที่อยู่ในรูปที่จะนำไปบริโภคว่ามีคุณภาพหรือสารสำคัญเป็นอย่างไร เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

วัตถุประสงค์ เพื่อวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (*in vitro*) สมบัติการต้านการอักเสบและต้านเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากผงเห็ดแชมปิญอง

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. สกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยน้ำร้อน และสกัดสารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำด้วยเอทานอล
2. วิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ และเบตากลูแคน
3. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในสารสกัดทั้ง 2 ส่วน
4. วิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดทั้ง 2 ส่วน โดยวิธี ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (Ferric Reducing Ability Power (FRAP) ความสามารถในการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระออกซิเจน (Oxygen Radical Absorbance Capacity ,ORAC) และ ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS)
5. ศึกษาผลของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ต่อการกระตุ้นและควบคุมระบบภูมิคุ้มกันและทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์ไลน์ (เซลล์เพาะเลี้ยง)
6. ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมจากสารสกัดโพลีแซคคาไรด์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

วิธีทดลอง

1. การสกัดโพลีแซคคาไรด์

สกัดโพลีแซคคาไรด์จากตัวอย่าง 2 วิธี คือ สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ใน อ่างควบคุมอุณหภูมิ และอ่างอวบคุมอุณภูมิร่วมกับคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic) ตามแผนผังดังนี้

ตัวอย่างผงเห็ดแชมปิญอง เติมน้ำอัตราส่วน ผงเห็ด : DI water = 1 g :30 ml

↓

วิธีที่ 1 บ่มในอ่างควบคุม อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที (Liu, *et al*., 2020)

วิธีที่ 2 บ่มในอ่างควบคุม อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส + คลื่นความถี่สูง นาน 62 นาที (Tian, *et al.,* 2012)

กรองด้วยผ้าแล้วเซนตริฟิวจ์ ที่ 10,000 x G 20 นาที ที่ 20 องศาเซลเซียส

เติม 95% alcohol 3 เท่าของปริมาตร

ตั้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชม.

เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x G 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

ล้างตะกอนด้วยน้ำแล้วทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried**)**

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์

วิเคราะห์ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมดด้วยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, *et al*., 1956) โดยการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plate) ปิดฝาแล้วแช่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 96-98% ในขณะที่ตัวอย่างเย็นจัด หลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล 5% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากันก่อนบ่มในอ่างน้ำร้อน (water bath) อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำขึ้นจากอ่างน้ำร้อน ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพร้อมฝาปิด ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader) (Tecan, Infinite M200) ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาความเข้มข้นของโพลิแซคคาไรด์จากค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1.2 วิเคราะห์ปริมาณเบตากลูแคน

ปริมาณกลูแคนทั้งหมดในผงเห็ด วิเคราะห์โดยใช้ ชุดทดสอบเบต้ากลูแคนในเห็ดและยีสต์ของบริษัทเมกาไซม์ (Mushroom and Yeast b-glucan Assay, K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int.)) ประกอบด้วย เอนไซม์ exo-1,3-β-glucanase, β -glucosidase, amyloglucosidase และ invertase, สารละลายหาปริมาณกลูโคส (GOPOD-glucose oxidase, peroxidase, 4-aminoantipyrine) และสารละลายมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์ปริมาณกลูแคนทั้งหมดโดยการย่อยตัวอย่างด้วย กรดซัลฟูริก 60% (โดยปริมาตร) ที่แช่เย็นแล้ว ในอ่างน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง และวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2

ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ exo-1,3-β-glucanase, β -glucosidase ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง วัดปริมาณกลูโคสทั้งหมดโดยการเติม สารละลาย GOPOD-glucose oxidase/peroxidase วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ปริมาณอัลฟากลูแคนวิเคราะห์โดยการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์ amyloglucosidase และ invertase แล้วหาปริมาณกลูโคสทั้งหมด ปริมาณเบตากลูแคนคำนวณได้ดังนี้

เบตากลูแคน = กลูแคนทั้งหมด – อัลฟากลูแคน

กลูแคนทุกค่าแสดงในหน่วย กลูโคสต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (g glucose/100 g dry basis)

2. การสกัดสารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำด้วยสารละลายเมทานอล

ตัวอย่าง 1.00 กรัม + 80% methanol 10.0 ml. เขย่าใช้ Vortex

Ultrasonic bath 20 min.

↓

Centrifuge 3500 rpm (10000 x g 15 นาที ที่ 4 C รวมส่วนใส (สกัด 2 รอบ)

↓

ทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

↓

ละลาย ของแข็งที่แห้งแล้วใน 80% methanol วิเคราะห์ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด

และสารต้านอนุมูลอิสสระโดยวิธี ORAC FRAP ABTS

3. วิเคราะห์สมบัติการต้านออกอนุมูลอิสระ

เนื่องจากเห็ดประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิด สารแต่ละชนิดจะมีกลไกในการต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารอาหาร ในการวิเคราะห์สมบัติออกซิเดชันทำการวิเคราะห์หลายวิธีเพื่อให้ครอบคลุมกลไกการต้านออกซิเดชันของสารอาหารที่มีในเห็ด

3.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 80% เมทานอล ตามวิธีของ Tangkanakul, *et al.,* (2005) ดัดแปลงเล็กน้อยโดยการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม เติมสารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu) ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเข้ากันดี ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอร์เนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตามด้วยเติมน้ำดีไอออไนซ์ (Dionized water) 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ บ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader) (Tecan, Infinite M200) ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic

acid) แสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลิก/กรัมตัวอย่าง (mg Gallice acid equivalent (GAE)/g sample)

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

ผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 3.675 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจือจางสารละลายผสมดังกล่าวด้วยน้ำปราศจากไอออน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.7±0.02 ปิเปตตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (25 – 1,000 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 48 หลุม โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวอย่างควบคุม เติมสารละลาย ABTS ที่เจือจาง 180 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์/กรัมตัวอย่าง (mM Trolox equivalent (TE)/g sample)

3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 40 μl ใส่ลงใน ลงในไมโครเพลท 48 หลุม เติม FRAP reagent (ประกอบด้วย 10 nM tripyridyltriazine (TPTZ) in 40 mM HCl : 20 mM FeCl 3.6XH_2O : 300 mM Acetate buffer pH 3.6 = 1:1:10) 300 μl warm at 37 องศาเซียลเซียส นำไปบ่มที่ 37 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดหาค่าดูดกลืนแสง ที่ 593 nm ด้วยอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท คำนวณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์/กรัมตัวอย่าง (mM Trolox equivalent (TE)/g sample)

3.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ORAC

ดัดแปลงเล็กน้อยตามวิธีของ Huang, *et al.,* (2002) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ความเข้มข้น 6.25 – 50 ไมโครโมลาร์ โดยใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)เป็นตัวอย่างเปล่า ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท 96 หลุม สีดำ เติมสารละลาย Fluorescine ความเข้มข้น 0.0816 ไมโครโมลาร์ ใน 75 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.4 เขย่าให้เข้ากันก่อนบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 2’-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ความเข้มข้น 152.26 มิลลิโมลาร์ ใน 75 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 25 ไมโครโมลาร์ นำไปวัดค่าการเรืองแสงของที่ความยาวคลื่น (emission wavelength) 535 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น (emission wavelength) 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าในรูปของพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox แสดงค่าในรูปของมิลลิโมลาร์สมมูลของ Trolox/กรัมตัวอย่าง (mM Trolox equivalent /g sample)

4. วิธีการทดสอบการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ทำการทดสอบโดยวิธี 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวน

ความมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม จำนวน 2 x 10^4 cells/100µl ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM สำหรับ MCF-7 (เซลล์มะเร็งเต้านม) และ DMEM/F12 สำหรับเซลล์ MCF-12A (เซลล์เต้านมปกติ) ที่ประกอบด้วย 10% FBS และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 10, 25, 50, 100, 125, 250, 500 และ 1,000 µg/ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml หลุมละ 100 µl แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งก่อนเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลุมละ 100 µl เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน นำไปบ่มต่อ 5 นาที จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \text{OD test cell} / \text{OD control} \times 100$$

5.ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากส่วนดอกและขาของเห็ดแชมปิญองต่อการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide (NO) ภายในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) โดยเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 wells plate (cell มีความเข้มข้น 2×10^5 cell/well) โดยบ่มเซลล์ใน CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย 1µg/ml LPS ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g นาน 4 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์มา 100 µl ใส่ใน 96 well plate เติม griess reagent และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณ NO ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วย microplate reader คำนวณค่าความเข้มข้นของ NO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกราฟมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$ และคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO โดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) ใช้สาร L-N G -nitroarginine methyl ester (L-NAME) (100µM) เป็นสารมาตรฐานควบคุมแบบบวก ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B) / (A-C)] \times 100$$ โดยที่

A-C : nitrite concentration; A : LPS (+), sample (-),

B: LPS (+), sample (+), C: LPS (-), sample (-)

6.การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยวิธี MTT assay

ทำการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม จำนวน 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย 1µg/ml LPS ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์

ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml หลุมละ 100 µl แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลุมละ 100 µl เพื่อละลายผลึกฟอร์มาซาน นำไปบ่มต่อ 5 นาที จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน แล้นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลท จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ

$$\% \text{ Cell viability} = \text{OD test cell} / \text{OD control} \times 100$$

7. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ TNF-α และ IL-6 ด้วยวิธี Sandwich ELISA

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (flat bottom cell culture plate) จำนวน 1 x 10^6 cells/500 µl ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ประกอบด้วย 10% FBS และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงกระตุ้นด้วย 1µg/ml LPS ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบ นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml และปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g นาน 4 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบน (supernatant) ที่ได้มาวัดปริมาณไซโตไคน์ที่สนใจด้วยชุดตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ชนิด TNF-α และ IL-6 ด้วยเทคนิค Sandwich ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) โดยในการทดสอบใส่ supernatant อาหารเลี้ยงเซลล์ ด้วยปริมาตรที่กำหนดลงใน 96 well plate ก้นเป็นรูปตัวยูที่ฉาบไว้แล้วด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ inflammatory marker แต่ละชนิด จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิที่กำหนด เพื่อให้เกิดเป็น complex ระหว่าง antigen และ antibody หลังจากชะล้าง plate เติม antibody ที่จำเพาะต่อ inflammatory marker แต่ละชนิดที่ติดฉลากด้วย biotin (biotin-conjugated antibody) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่กำหนด จากนั้นชะล้าง plate แล้วเติม streptavidin-HRP conjugate บ่มที่อุณหภูมิที่กำหนด ตามด้วยการชะล้างการจับที่ไม่จำเพาะออกแล้วเติม TMB substrate จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm

ผลการศึกษา

การสกัดโพลีแซคคาไรด์และปริมาณโพลีแซคคาไรด์

ผงเห็ดแชมปิญองที่ทำการศึกษา มี 2 ส่วนคือส่วนที่ได้จากดอกและขา ส่วนดอก มีความชื้น 7.45 $\pm$ 0.22% ขา ความชื้น 7.50 $\pm$ 0.12% สกัดโพลีแซคคาไรด์ 2 วิธี

1. สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง

2. สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูง นาน 62 นาที

จากการทดลองพบว่าการสกัดด้วยวิธีที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% yield) สูงกว่าสกัดด้วยน้ำร้อนอย่างเดียว ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ปริมาณกลูแคนในตัวอย่างผงส่วนดอกและขาแสดงดังตารางที่ 1 และเลือกตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีที่ 2 มาทำการศึกษาต่อ

ผลจากการสกัดโพลีแซคคาไรด์แบบหยาบจากตัวอย่าง พบว่า เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ อยู่ในช่วง 5.56-8.08 % ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Qiao, *et al.,* (2012) ซึ่งสกัดได้ 5.60% และในส่วนดอกสกัดได้มากกว่าส่วนขา ในขณะที่ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ Qiao, *et al.,* (2012) สกัดได้เท่ากับ 75.48% แต่ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ในสารสกัดได้เพียง 30.76 - 44.29% น้อยกว่าที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากขึ้นอยู่กับตัวอย่างสายพันธุ์เห็ด อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และสภาพบรรยากาศที่เพาะเลี้ยง รวมถึงสภาวะของการทำแห้งด้วย โพลีแซคคาไรด์ที่อยู่ในรูปกลูแคนที่พบในผงดอกเห็ดและขาเห็ด เท่ากับ 13.09 $\pm$ 1.20% และ 16.13 $\pm$ 2.44% ตามลำดับ โดยกลูแคนที่จะอยู่ในรูปของ เบต้ากลูแคน ซึ่งเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการเกิดเนื้องอก ฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด มีปริมาณ 12.83 $\pm$ 1.21% และ 15.59 $\pm$ 2.44% ในขาและดอก ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณเบต้ากลูแคน ในส่วนขามีมากกว่าในส่วนดอก และปริมาณเบต้ากลูแคนในส่วนขา มากกว่างานวิจัยของ Khan, *et al.,* (2017) เกือบ 2 เท่า (เบต้ากลูแคนเท่ากับ 8.511 $\pm$ 2.45%)

ตารางที่ 1 ปริมาณโพลีแซคคาไรด์ และเบตากลูแคนในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากผงเห็ดแชมปิญอง

	ดอก	ขา
ความชื้น (%)	7.45 $\pm$ 0.22	7.50 $\pm$ 0.12
เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ (%yield) สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์(polysaccharide crude extract) (%, กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)	8.08 $\pm$ 0.056	5.56 $\pm$ 0.01
โพลีแซคคาไรด์ทั้งหมด (% ,กรัม/100 กรัมสารสกัด)	44.29 $\pm$ 0.05	30.76 $\pm$ 0.01
โพลีแซคคาไรด์ทั้งหมด (% ,กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)	3.58 $\pm$ 0.10	1.71 $\pm$ 0.10
กลูแคนทั้งหมด (% ,กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)	13.09 $\pm$ 1.20	16.13 $\pm$ 2.44
อัลฟากลูแคน(% ,กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)	0.264 $\pm$ 0.027	0.543 $\pm$ 0.124
เบต้ากลูแคน (% ,กรัม/100 กรัมตัวอย่าง)	12.83 $\pm$ 1.21	15.59 $\pm$ 2.44

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อนทั้งในส่วนดอกและขา 3 วิธี การประเมินสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธีแต่ละวิธีวัดกลไกการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เหมือนกันเนื่องจากการเกิดปฏิกริยาระหว่าง อนุมูลิสระ สารตั้งต้น และสารต้านอนุมูลิอิสระค่อนข้างซับซ้อน FRAP เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในการให้อีเลคตรอนแก่อนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระรับอีเลคตรอนแล้วเปลี่ยนอยู่ในรูปที่เสถียร ดังนั้นอนุมูลอิสระจะถูกยับยั้งไม่เกิดปฏิกริยา ABTS วัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ ในการดักจับหรือกำจัด (scavenge) อนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radicle) ในสารละลายที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ ส่วน ORAC เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้ง (inhibition) การเกิดเพอร็อกซิลแรดดิเคิล ($ROO^{\bullet}$) วัดทั้งระยะเวลาในการยับยั้งและระดับของการยับยั้ง (degree of inhibition) เป็นวิธีเดียวที่วัดทั้ง 2 แบบ ผลการทดลองในสารสกัดด้วยน้ำร้อน ดังแสดงในตารางที่ 2

การสกัดด้วยน้ำร้อนสารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดหยาบยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นสารสกัดจะมีองค์ประกอบอื่นที่ละลายน้ำได้นอกเหนือจากสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ โปรตีน สารประกอบฟีโนลิก และวิตมินที่ทนความร้อน เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดพบในสารสกัดส่วนดอกและขา เท่ากับ 1.35%

ตารางที่ 2 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ (สารกลุ่มที่ละลายน้ำ)

	ดอก	ขา
Total phenolic (mg GAE /1 g crude polysaccharide extract)	1.35 ± 0.0	0.64 ± 0.01
FRAP (µmole TE/1 g crude polysaccharide extract)	67.43 ± 7.04	42.48 ± 0.81
ABTS (µmole TE/1 g crude polysaccharide extract))	46.56 ± 0.0	29.01 ± 0.55
ORAC (µmole TE/1 g crude polysaccharide extract)	279.21 ± 4.72	160.68 ± 0.0

ส่วนขา 0.64% ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Song, W. and Van Griensven, L.J.L.D.(2008) รายงานว่า สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากเห็ดสมุนไพรประกอบด้วยสารประกอบฟีโนลิก จากการทดลองพบในสารสกัดหยาบจากดอกมีค่ามากกว่าส่วนขา และมีค่ามากกว่าเห็ดแชมปิญองจากการวิจัยของ Radzki และคณะ (Radzki, *et al.,* 2019) ซึ่งวัดได้ 0.83 ± 0.04% สมบัติการต้านอนุมูลอิสระก็เช่นเดียวกัน วัดทั้ง 3 วิธี ในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากดอกมีค่าสูงกว่าจากขา

การสกัดด้วยสารละลายเมทานอลเป็นการสกัดสารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ สารกลุ่มนี้ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ และเมื่ออยู่ในอาหาร หรือในระบบสิ่งมีชีวิตจะละลายในไขมัน ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด 80% เมทานอล (สารกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ)

	ดอก	ขา
Total phenolic (mg GAE./g sample)	3.16 ± 0.52	2.39 ± 0.50
FRAP (µmole TE/g sample)	25.66 ± 0.84	17.26 ± 2.48
ABTS (µmole TE/g sample)	20.88 ± 0.00	6.33 ± 0.12
ORAC (µmole TE/g sample)	167.79 ± 14.85	147.57± 3.72

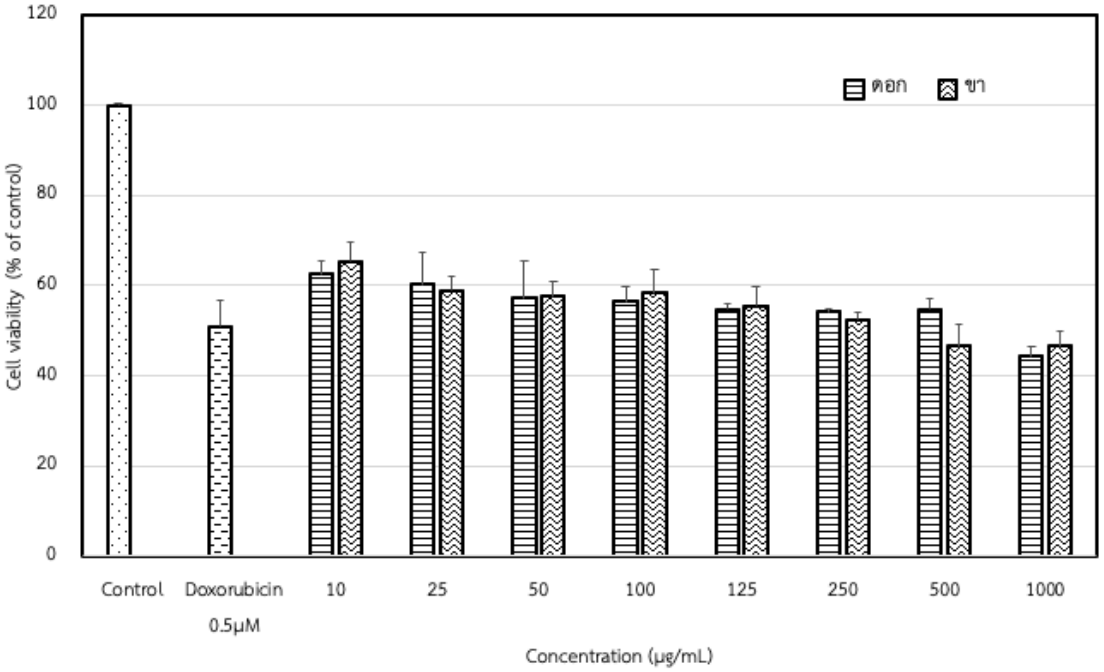
สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยเมทานอล เป็นสารประกอบที่อยู่แบบอิสระ พบในผงส่วนดอก (3.16 $\pm$ 0.52 mg GAE./g sample) มากกว่าในส่วนขา (2.39 $\pm$ 0.50 mg GAE./g sample) เช่นเดียวกันกับปริมาณที่พบในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ Song, W., & Van Griensven, L.J. L.D. (2008) รายงานว่าสมบัติการกำจัดอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ และ Islam *et al*., (2016) วิจัยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิก ฟลาโวนอยด์ และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดในประเทศจีน 43 ชนิด พบว่าสารประกอบฟีโนลิกในเห็ดมีความสัมพันธ์กับสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในส่วนดอกที่สกัดด้วย 80% เมทานอลมีประมาณมากกว่าในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ (1.35 $\pm$ 0.0) 2.3 เท่า และส่วนขามากกว่า 3.7 เท่า ถึงแม้ว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกซึ่งมีสมบัติในการต้านอนมูลอิสระจะมีมากกว่า แต่เมื่อพิจารณาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ทั้ง 3 วิธี พบว่ามีค่าต่ำกว่าที่พบในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 3 วิธี ดังนั้นเป็นไปได้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนโพลีแซคคาไรด์-ฟีนอล ส่งเสริมสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารประกอบฟีโนลิกที่อยู่แบบอิสระที่มีอยู่ในสารละลาย 80% เมทานอลที่ใช้สกัด ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกในเห็ดและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ เห็ดที่มีการศึกษาวิจัยที่ประเทศจีนโดย Islam, *et al*., (2016) สกัดสารประกอบฟีโนลิกจากเห็ดวิเคราะห์ปริมาณสารประ กอบฟีโนลิก ฟลาโวนอยด์ และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเห็ดในประเทศจีน 43 ชนิด พบว่าปริมาณสารประกอบฟีโนลิกมีค่าอยู่ระหว่าง 0.22 – 11.93 mg GAE./g sample) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระวัดโดยวิธี ABTS มีค่าอยู่ระหว่าง 2.22 – 109.9 µmole TE/g sample ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระวัดโดยวิธี ABTS ของตัวอย่างเห็ดแชมปิญองที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่าอยู่ในระดับปานกลาง และพบว่าในสารสกัดจากดอกจะให้ค่าที่สูงกว่าในส่วนขา

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

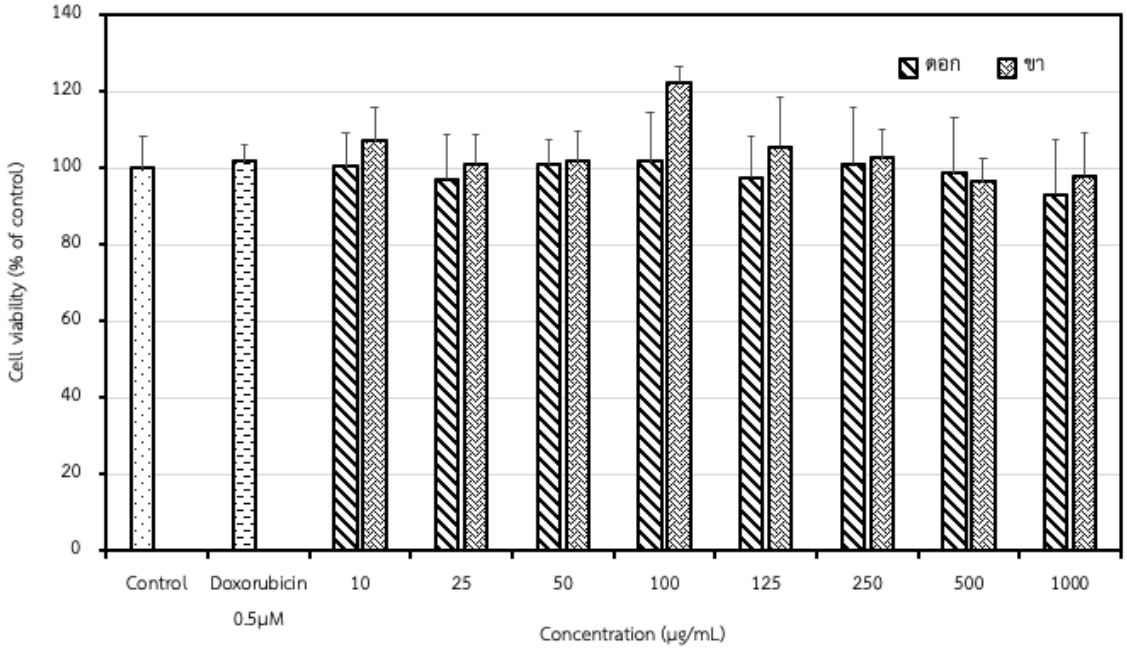
จากการทดสอบผลของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากส่วนดอกและขาของเห็ดแชมปิญองที่ความเข้มข้น 10-1000 ug/ml ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 เทียบกับเซลล์เต้านมปกติ พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองทั้งส่วนดอกและขาเห็ดที่ความเข้มข้น 10-1000 ug/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง จะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ที่ต่ำกว่าร้อยละ 80 โดยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองเป็นแบบ dose-dependent นั้นคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จะสามารถยับยั้งการเจริญได้เพิ่มขึ้น และพบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1000 ug/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ 44.31% และ 46.46% เมื่อใช้สารสกัดจากดอกและขา ตามลำดับ สูงกว่ายา doxorubicin (0.5 µM) (0.29 µg/ml) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (รูปที่ 1A) และเมื่อทดสอบเปรียบเทียบผลของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองทั้งส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้นดังกล่าวต่อการรอดชีวิตของเซลล์เต้านมปกติชนิด MCF-12A พบว่าความเข้มดังกล่าว (10-1000 µg/ml) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยจะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเซลล์เต้านมปกติที่มีค่ามากกว่าร้อย 80 เช่นเดียวกับยา doxorubicin (0.5 µM) ที่พบว่าไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เต้านมปกติเช่นกัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากจะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เต้านมปกติแล้วสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL ยังกระตุ้นจำนวนการรอดชีวิตของ

เซลล์ เต้านมได้อีกด้วย เห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่มีค่ามากกว่า 100% (รูปที่ 1B)

(A)



(B)



รูปที่1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขา ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (A) เทียบกับเซลล์เต่านมปกติ MCF-12A (B)

ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบหรือสารภูมิคุ้มกัน

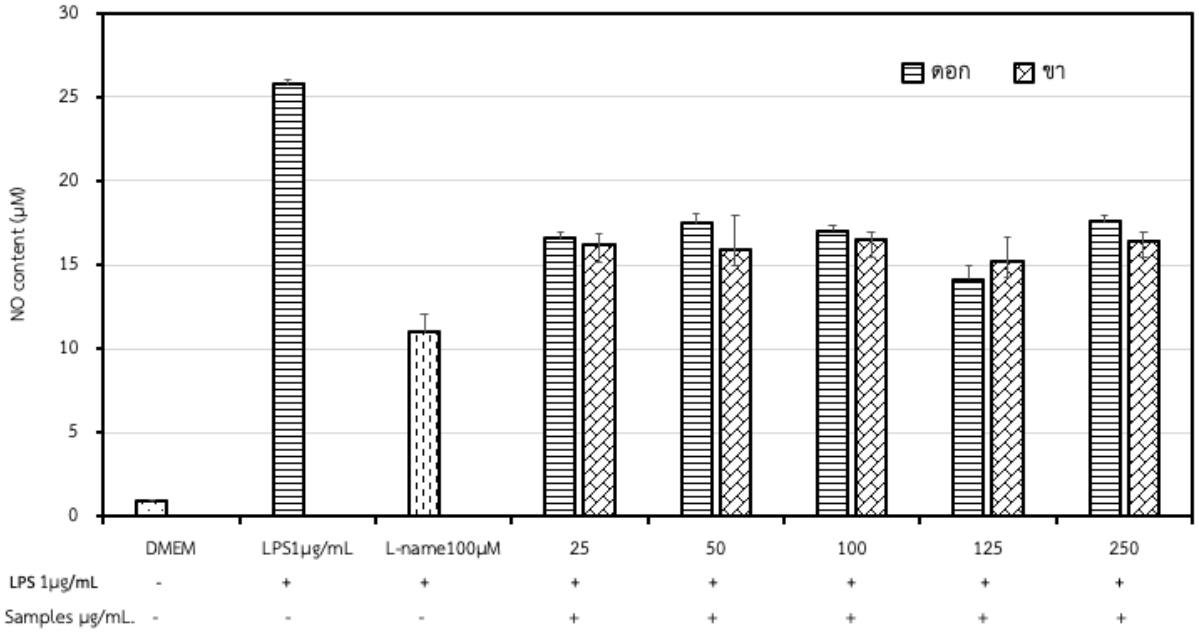
การอักเสบเป็นผลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ต่อสิ่งเร้า หรือสิ่งแปลกปลอม เช่น เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส รา ที่เข้ามาก่อโรคในร่างกาย ขณะเดียวกันการอักเสบสามารถเกิดขึ้นได้จากโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอยู่แล้วในร่างกายผู้ป่วย ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) พรอสตาแกลนดิน E_2 (prostaglandins E_2) และไซโตไคน์ (cytokine) กลุ่มที่ส่งผลให้เกิดการอักเสบต่อเนื้อเยื่อ (pro-inflammatory cytokine) เช่น tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β และ interleukin-6 (IL-6) เป็นต้น (Van der Vilet, 2000; Jung *et al.,* 2009) เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน อย่างไรก็ตามการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ ในปริมาณมากเกินไป หรือเกิดการอักเสบต่อเนื่องและเกิดขึ้นซ้ำ ๆ แบบเรื้อรัง ก็จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นเกิดพยาธิสภาพ ส่งผลให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง หรือกลุ่ม โรคเรื้อรัง เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น การยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ IL-6 และ TNF-α ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบจากการวิเคราะห์ปริมาณการสร้าง nitric oxide (NO)

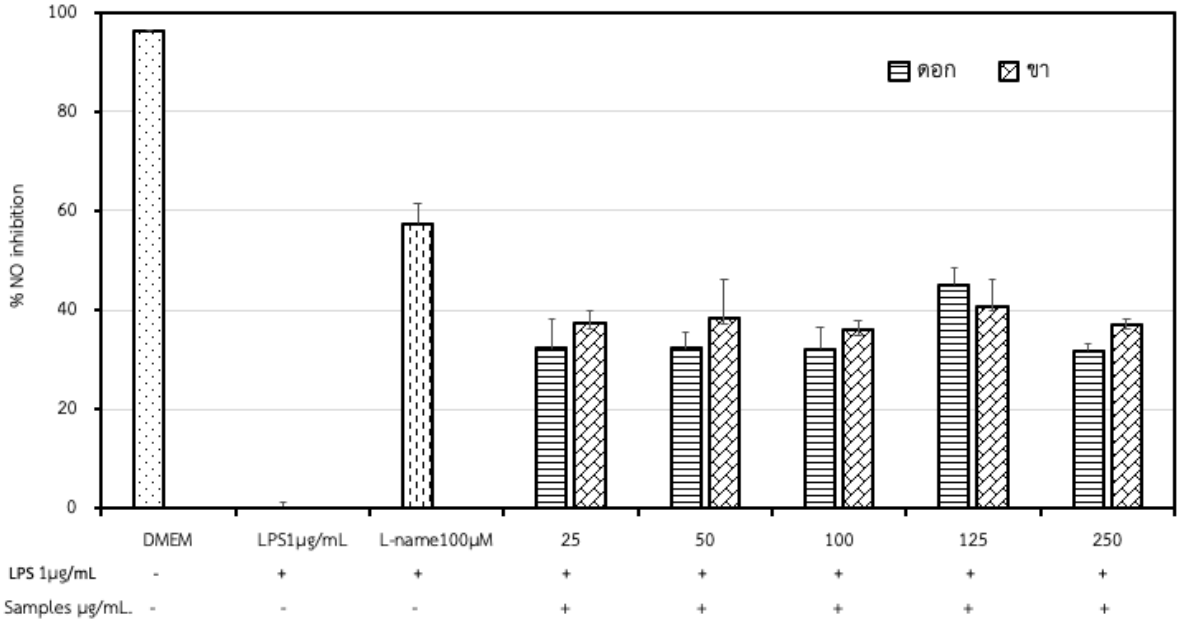
NO จัดเป็นสารสื่อชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ เนื่องจากในกระบวนการอักเสบพบว่า NO จะถูกสร้างขึ้นในปริมาณสูงมากจากการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งการสร้างปริมาณ NO ที่สูงเกินไปก่อให้เกิดการตายของเซลล์ (เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน) หรือ ความเสียหายของเนื้อเยื่อ จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW264.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS)บวกกับสัมผัสกับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 µg/mL เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS เพียงอย่างเดียว (ชุดควบคุม) และชุดควบคุมเชิงบวกที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ร่วมกับการได้รับสารมาตรฐาน L-NAME (100 µM) และชุดควบคุมเชิงลบที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS เมื่อพิจารณาปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ พบว่าการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 µg/ml มีปริมาณเท่ากับ 15.24–16.50 µM ซึ่งต่ำกว่าในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียวที่มีปริมาณสูงเท่ากับ 25.75 µM แต่ยังสูงกว่าในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับสารมาตรฐาน L-NAME ที่มีปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ต่ำสุดเท่ากับ 10.99 µM (รูปที่ 2A)จะเห็นได้ว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ดี เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่รับสารสกัด

แต่ถูกกระตุ้นให้เกิดการเสบด้วย LPS อย่างเดียว เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาความเข้มข้น 25-250 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ 31.82-45.15% และ 35.94-40.81% ตามลำดับ ส่วนในเซลล์ที่ได้รับสารมาตรฐาน L-NAME สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ 57.33% ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการเสบด้วย LPS อย่างเดียว ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้เลย (รูปที่ 2B) เมื่อพิจารณา cell viability พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 จะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่มีค่ามากกว่า 80% (รูปที่ 2C) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกที่ความเข้มข้น 100-125 µg/ml นอกจากจะไม่เป็นพิษแล้วยังสามารถเพิ่มจำนวนการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจได้อีกด้วย

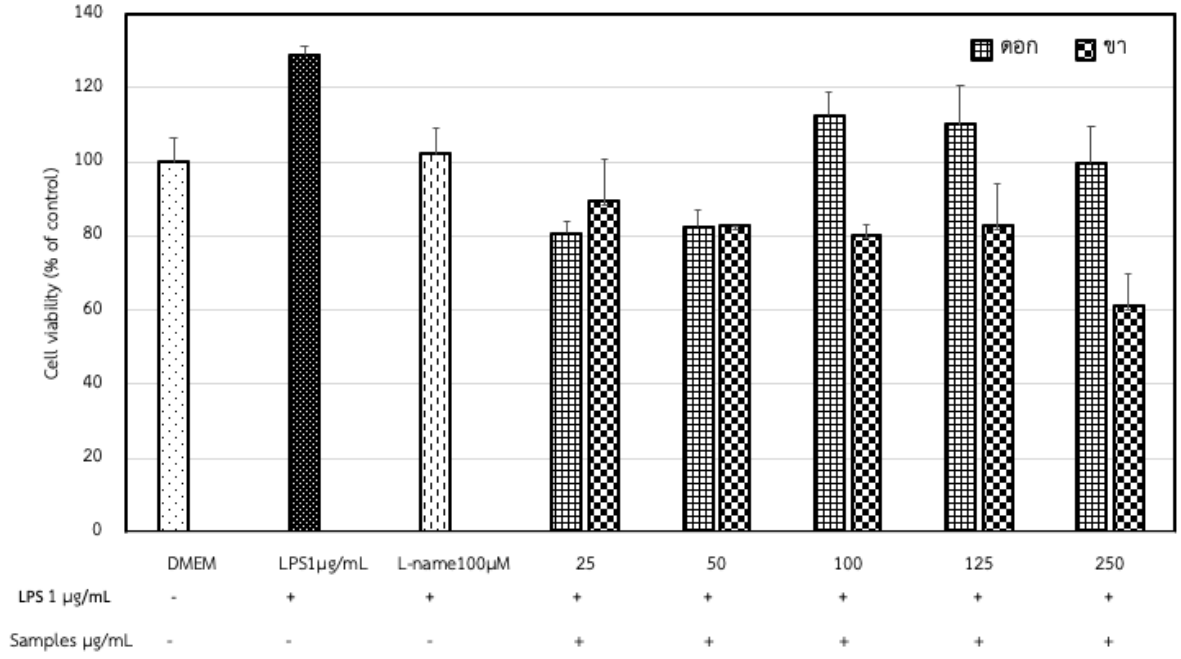
(A)



(B)



(C)

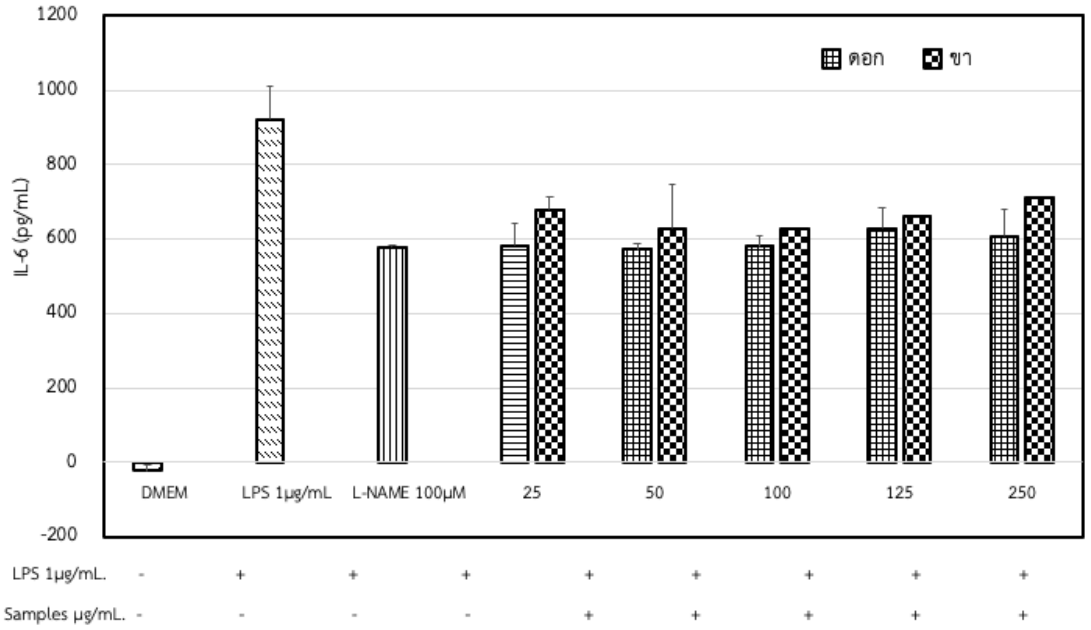


รูปที่ 2 การสร้างไนตริกออกไซด์ และ cell viability ของเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบด้วย L-NAME และ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาในสภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS โดย A คือ ปริมาณการสร้าง nitric oxide B คือ การยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ C คือ cell viability ของ เซลล์ที่ทรีทด้วยสารสกัดและ L-NAME

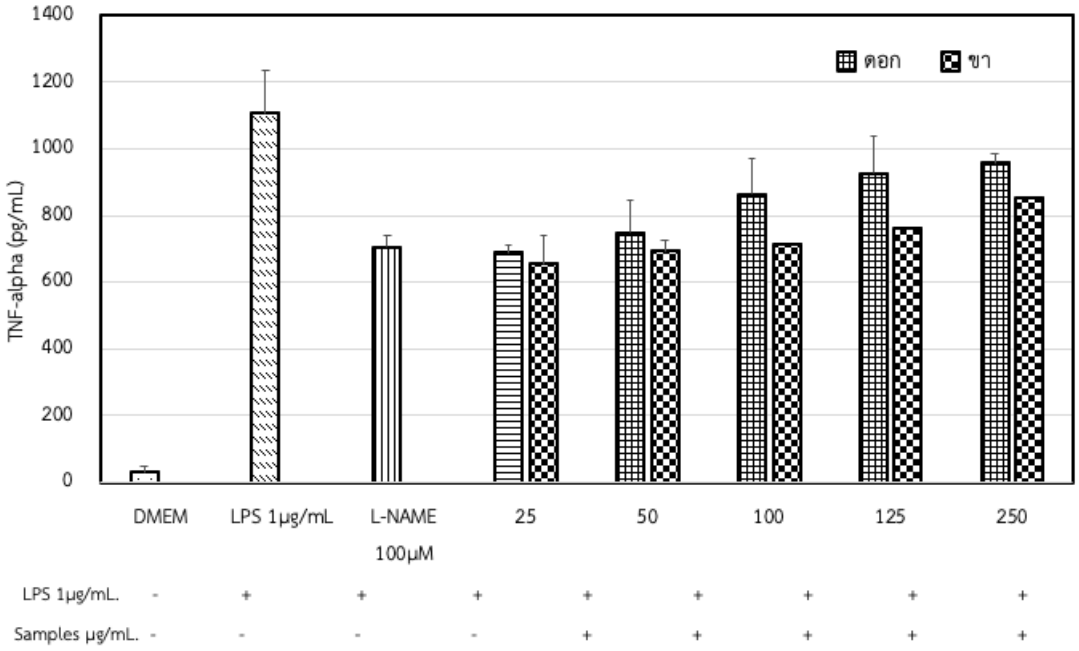
ฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 และ TNF-α

IL-6 และ TNF-α เป็น cytokine ซึ่งเป็นสารที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ และเป็น proinflammatory cytokines ที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในทุกระยะของสภาวะที่เกิดการอักเสบ การยับยั้ง proinflammatory cytokine ทั้งสองจัดเป็นเป้าหมายหนึ่งที่สำคัญ ในการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง การเกิดโรคเบาหวาน โรคอ้วน รวมทั้งการเกิดมะเร็ง จากการทอสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขา ในการยับยั้งการหลั่ง IL-6 และ TNF-α ในเซลล์ RAW264.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร LPS พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาที่ความเข้มข้น 25-250 µg/ml สามารถยับยั้งการหลั่งทั้ง IL-6 และ TNF-α เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว โดยพบปริมาณสาร IL-6 และ TNF-α ในสารสกัดส่วนดอก (571-629 และ 690-960 pg/ml) สูงกว่าในสารสกัดสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนขา (626-712 และ 654-855 pg/ml) จากปริมาณสาร IL-6 และ TNF-α ที่พบแสดงให้เห็นว่า สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งทั้ง IL-6 ดีกว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนขา และ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนขาให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง TNF-α ดีกว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอก แต่น้อยกว่าในเซลล์ที่ได้รับสารมาตรฐาน L-NAME ในขณะที่ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างเดียว ไม่สามารถยับยั้งการหลั่งของทั้ง IL-6 และ TNF-α (รูปที่ 3A-3B)

(A)



(B)



รูปที่ 3 การผลิต IL-6 (A) และ TNF-α (B) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วย L-NAME และ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะที่มีการชักนำด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทสรุป

ผงเห็ดแชมปิญอง มีสารสำคัญประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ เบต้ากลูแคน (12.83-15.59%) และสารประกอบฟีโนลิก จากการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยตรวจทั้งในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและสกัดด้วยเมทานอล พบว่าในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ และสารสกัดเมทานอล มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบโดยวิธี FRAP ABTS และ ORAC และในสารสกัดจากดอกจะให้ค่าที่สูงกว่าในส่วนขา

สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญองส่วนดอกและขาช่วยยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบไนตริกออกไซด์ IL-6 และ TNF-α ได้ ฤทธิ์การยับยั้งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปเหล่านี้เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ทดสอบโดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เทียบกับเซลล์เต้านมปกติ MCF-12A พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเป็นแบบ dose-dependent โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จะสามารถยับยั้งการ

เจริญเซลล์มะเร็งได้เพิ่มขึ้น และพบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมสูงกว่ายา doxorubicin (ความเข้มข้น 0.29 µg/mL)

ผลการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้ว่าเห็นผงเห็ดแชมปิญองมีคุณค่าทางอาหาร มีสารสำคัญที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไป ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม **และมีความเป็นไปได้** ในการนำสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดแชมปิญอง ไปใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร หรืออาหารเสริมหรือใช้ผงเห็ดเป็นอาหารเสริม เพื่อป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ การยับยั้งการเกิดมะเร็งเต้านม อย่างไรก็ดี ต้องศึกษาหาวิธีการสกัด ให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้น และควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดโพลีแซคคารไรด์ในสัตว์ทดลองและวิจัยทางคลินิคต่อไป เพื่อให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจถึงประสิทธิผลในการบริโภค

เอกสารอ้างอิง

Dubois. M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. (1956). Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**. 28(3): 350-356.

Feng, Y., Zhang, J., Wen, C., Dzah, C.S., Juliet, I.C., Duan, Y. and Zhanga, H. 2020. Recent advances in *Agaricus bisporus* polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities. **Process Biochemistry.** 94: 39-50.

Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-woodill, J.A. Flanagan and R.l. Prior. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **J. Agric. Food Chem.** 50: 4437-4444.

Islam, T., Yu, X., and Xu, B. 2016. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. **LWT - Food Science and Technology** 72: 423 – 431.

Khana, A.A., Gania, A., Masoodia, F.A., Mushtaq, U. and Naikc, A.S. 2017. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β–glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus, Pleurotus ostreatus* and *Coprinus attrimentarius.* Bioactive **Carbohydrates and Dietary Fibre**. 11: 67-74.

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J.P.F.G., and Van Griensve, L.J.L.D. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis, Ganoderma lucidum and Phellinus linteusn* **Food Chemistry.** 129: 1667–1675.

Liu, G., J. Ye, W. Li, J. Zhang, Q. Wang, X. A. Zhu, J. Y. Miao, *et al*. 2020. Extraction, structural characterization, and immunobiological activity of ABP Ia polysaccharide from *Agaricus Bisporus*. **International Journal of Biological Macromolecules.** 162: 975-84. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.

Qiao, D.L., Zhao, F., Huang, H.Z., Fan, C.C., Han, L. 2012. Ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from *Agaricus bisporus*. **Journal of Chinese medicinal materials**. 35 (8): 1340-1347.

Radzki, W., Ziaja-Sołtys, M., Nowak, J., Topolska, J., Bogucka-Kocka, A., Sławinska, A., Michalak-Majewska, M., Jabłonska-Rys, E. and Kuczumow, A. 2019. Impact of processing on polysaccharides obtained from button mushroom (*Agaricus bisporus*) **International Journal of Food Science and Technology.** 1-8.

Tangkanakul, P., G. Trakoontivakorn and C. Jariyavattanaviji. 2005. Extracts of thai indigenous vegetables as rancid inhibitor in a model system. **Kasetsart Journal: Natural Science**. 39: 274-283.

Tian, Y., H. Zeng, Z. Xu, B. Zheng, Y. Lin, C. Gan, and Y. M. Lo. 2012. "Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus Bisporus*)." **Carbohydrate Polymers.** 88(2): 522-29.

Sezer,Y.Ç., Süfer, Ö. and Sezer, G. 2017. Extraction of phenolic compounds from oven and microwave dried mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*) by using methanol, ethanol and aceton as solvents. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.** 51(3): S393-S397.

Song, W. and Van Griensven, L.J.L.D. 2008. Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 10: 315–324.