การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว และฤทธิ์ต้านมะเร็ง ของสารสกัดจากเห็ดอูดิมาน

อมรรัตน์ สีสุกอง[*] จิราภรณ์ บุราคร[**]
ปรานต์ ปิ่นทอง[**] อภิรัชต์ สมฤทธิ์[***]

[*]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพฯ
[**]กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ
[***]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
Corresponding author e-mail : amornrats@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว และฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากเห็ดอูดิมาน (*Oudemansiella canarii*) การสกัดสารออกฤทธิ์จากดอกเห็ดอูดิมานใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus sphaericus* TISTR 1048, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Serratia marcescens* TISTR 1354 และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus sphaericus* โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 12.75±2.07 มิลลิเมตร (ทดสอบ 3 ซ้ำ) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe grisea*) ได้ด้วยวิธีทดสอบ Resazurin microplate assay (REMA) โดยมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเท่ากับ 97.83 ดังนั้นสารสกัดจาก *Oudemansiella canarii* ในการทดลองนี้มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อราโรคใบไหม้ข้าวได้ เพราะมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราค่อนข้างสูง แต่สารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ทดสอบ ได้แก่ มะเร็งในช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-Small- cell lung cancer)

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์/ ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว/ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง/ สารสกัด/ เห็ดอูดิมาน

The Study of Antibacterial, Anti-Rice Disease Fungi and Anticancer Activities in *Oudemansiella canarii* Extracts

Amornrat Srisukong[*] Jiraporn Burakorn[**]
Pran Pinthong[**] Apirat Somrit[***]

[*]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangkok
[**]Department of Science Service, Ministry of Science and Technology, Bangkok
[***]Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok

Abstract

This research aimed to study the antibacterial, anti-rice disease fungi and anticancer activities of extracts from *Oudemansiella canarii.* Crude extracts from dried fruiting body of *Oudemansiella canarii* were partitioned by using three organic solvents, hexane, ethyl acetate and methanol. Antibacterial activities of three crude extracts against four bacteria stains including *Bacillus sphaericus* TISTR 1048, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Serratia marcescens* TISTR 1354 and *Escherichia coli* were determined by Agar disc diffusion method. The results showed that hexane crude extract could inhibit *Bacillus sphaericus* with the inhibition zone of 12.75 ± 2.07 mm. (n=3). Moreover, hexane crude extract could inhibit rice blast disease fungi (*Magnaporthe grise*) by Resazurin microplate assay (REMA), with an inhibition percentage of 97.83. This suggests that the extract has a potential to develop a biocontrol agent. In addition, three crude extracts had no effect on anti-cancer KB cell line (human oral cavity cancer), anti-cancer MCF-7 cell line (human breasts cancer) and anti-cancer NCl-H187 cell line (human small- cell lung cancer).

Keywords : Antibacterial/ Anti-rice disease fungi/ Anticancer/ Extracts/ *Oudemansiella canarii*

บทนำ

เห็ดหลายสายพันธุ์มีศักยภาพที่จะใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้ โดยมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายในเห็ดที่มีผลต่อการปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน (Immuno modulating) ได้แก่ สาร Polysaccharides, High-molecular-weight polysaccharides, Low-molecular-weight protein bound polysaccharides, Glyco-proteins (lectins), Triterpenoids และ Fungal immunomodulatory proteins เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้ มีสมบัติยับยั้งเนื้องอก (Antitumor) และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Ohno *et al*., 2000; Jose *et al*., 2002; Ajith & Janardhanan, 2003; Bezivin *et al*., 2003; Chang & Miles, 2004; Fan *et al*., 2006) และมีรายงานว่าในเห็ดมีสาร Polysaccharide มากกว่า 1 ชนิดที่มีฤทธิ์เป็น Antitumor (Borchers *et al*., 1999)

เห็ดในสกุล *Oudemansiella* พบทั่วไปในเขตร้อน เช่น ในอเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอฟริกา และเอเชีย เป็นสายพันธุ์เห็ดที่รับประทานได้ ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารที่ดีเหมาะสมในการเป็นแหล่งอาหาร โดยมีการบริโภคเห็ดสกุลนี้อย่างแพร่หลายในประเทศไทย กรมวิชาการเกษตรได้รวบรวมเก็บเห็ด *Oudemansiella* spp. มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 โดยพบที่จังหวัดตาก และจังหวัดสุราษฎร์ธานี และตัวอย่างเห็ดเหล่านั้นได้จำแนกไว้เป็น *Oudemansiella canarii* และ *Oudemansiella radicata* พร้อมกันนั้นได้ทำการศึกษาประเมินการใช้ประโยชน์เพื่อให้ได้เชื้อพันธุ์ไว้เป็นทรัพย์สินและนำไปใช้เป็นเชื้อเห็ดบริการของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย (อัจฉรา พยัพพานนท์, 2545) โดยเห็ด *Oudemansiella canarii* ที่เก็บมาจากจังหวัดตาก เกิดบนตอไม้ผุสีผิว และลักษณะของหมวกคล้ายเห็ดหอม แต่มีความเป็นเมือก เนื้อหมวกหนา ขณะยังไม่บานก้านดอกสีขาวมีขนบางๆ เนื้อกรุบและเห็ดสามารถเพาะให้เกิดดอกโดยเทคนิคเพาะเห็ดถุง (อัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ, 2555)

มีรายงานในต่างประเทศถึงคุณประโยชน์ของเห็ดอูดิมานอย่างมากมาย ทั้งคุณค่าทางยาและคุณค่าทางการเกษตร โดยพบว่าเห็ดมีปริมาณสารอาหารสูง สารสกัดจากเห็ดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งและเนื้องอก (Luiz *et al*., 2005) มีรายงานว่าเห็ดบางชนิดในสกุล *Oudemansiella* spp. มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคมนุษย์ (Denisova, 2001; Reshetnikos *et al*., 2001; Vahidi & Namjoyan, 2004) ในงานวิจัยของ Rosa และคณะ (2003) พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ด *Oudemansiella canarii* มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคผิวหนัง เช่น *Candida albicans*, *C. glabrata, C. krusei* และ *C. tropicalis* เป็นต้น ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคพืช เช่น *C. sphaero-permum* สารสำคัญที่พบในเห็ด ได้แก่ สาร Oudemansin (Anke *et al*., 1983) Strobilurins (Anke, 1997) และ Polysaccharide (Zou, 2005) โดยสารประกอบบางชนิดจากเห็ด มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Luiz *et al*., 2005)

จะเห็นได้ว่าเห็ดอูดิมานมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านอาหาร การแพทย์ และการเกษตร ดังนั้นในการวิจัยนี้เป็นการต่อยอดผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งสามารถเพาะเห็ดอูดิมานได้ และมีแนวทางที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในเชิงพาณิชย์ แต่งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ด *Oudemansiella canarii* สายพันธุ์ที่ค้นพบจากจังหวัดตาก ในประเทศไทย ยังมีรายงานการศึกษาไม่มาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเห็ด *Oudemansiella canarii* ที่อาจจะมีศักยภาพสำหรับนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว และฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเห็ด *Oudemansiella canarii*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบ

เห็ดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเห็ดอูดิมาน *Oudermansiella canarii* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ค้นพบที่จังหวัดตาก ส่วนที่นำมาใช้ในการทดลอง คือส่วนดอกเห็ด (Fruiting body) โดยได้เพาะเลี้ยงดอกเห็ดที่กรมวิชาการเกษตร ในช่วงเดือนสิงหาคม - กันยายน พ.ศ. 2555 ลักษณะของดอกเห็ดอูดิมานแสดงดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ลักษณะของดอกเห็ดอูดิมาน *Oudemansiella canarii*

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสารจากดอกเห็ดอูดิมาน

นำดอกเห็ดอูดิมานมาล้างให้สะอาด จากนั้นนำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างดอกเห็ดอูดิมานอบแห้ง จำนวน 50 กรัม ต่อการหมัก (Maceration) ด้วยเมทานอล 500 มิลลิลิตร มาบดให้ละเอียด นำมาห่อด้วยผ้าขาวบาง ปิดปากห่อแล้วนำไปแช่ในเมทานอล 99.8% (AR grade, บริษัท Loba Chemie Pvt. Ltd, ประเทศอินเดีย) ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน จึงนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1, บริษัท Whatman international, ประเทศอังกฤษ) ทำการแช่สกัดดอกเห็ดอูดิมานซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ แล้วนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Buchi รุ่น R-205/V, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) ใช้ความดัน 230 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งมากขึ้นด้วยเครื่อง Freeze dry (Heto model Lyopro 3000, ประเทศเดนมาร์ก) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้มาชั่งน้ำหนัก ได้ของเหลวสกัดเมทานอล (Aqueous methanol) น้ำหนัก 26.66 กรัม จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ จำนวน 26.66 กรัม มาละลายด้วยน้ำขจัดไอออนแล้ว (Deionized water, DI) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเทใส่กรวยแยก ขนาด 1,000 มิลลิลิตร พร้อมเติมน้ำ DI ลงไปอีกประมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้สารละลายละลายเข้ากัน ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ลำดับ ได้แก่

เฮกเซน (AR grade, Qrec, ประเทศนิวซีแลนด์) เอทิลอะซิเตท (AR grade, Qrec, ประเทศนิวซีแลนด์) และเมทานอล (AR grade, Qrec, ประเทศนิวซีแลนด์) โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปจำนวน 150 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที แล้วไขเอาสารละลายส่วนบน (ชั้นตัวทำละลายอินทรีย์) ทำการสกัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ซึ่งจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป การคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบ (% yield) (อรพิน เกิดชูชื่น, 2010) โดยคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ yield (w/w)} = \frac{\text{weight of extract (g)} \times 100}{\text{weight of raw materials (g)}}$$

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืช และฤทธิ์ต้านมะเร็ง

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Agar disc diffusion

2.1.1 วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยง *Bacillus sphaericus* TISTR 1048, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Serratia marcescens* TISTR 1354 และ *Escherichia coli* ในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่า Absorbance อยู่ระหว่าง 0.03 - 0.3 (จำนวนเซลล์ 10^6 CFU/ml)

2.1.2 วิธีการเตรียมสารสกัด

ละลายสารสกัดด้วยสารทำละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ร้อยละ 5 เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 10,000 1,000 และ 100 ppm จากนั้นดูดสารสกัด 20 ไมโครลิตร หยดลงบน Paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร สำหรับ Paper disc ชุดควบคุมจะใช้ DMSO ร้อยละ 5 หยดลงบน Paper disc แทนสารสกัด

2.1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเห็ดอูดิมาน ด้วยวิธี Agar disc diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Rauha *et al*. (2000) เตรียมอาหารแข็ง Nutrient agar ในจานเพาะเลี้ยง ใช้ไม้ปลายพันสำลี (Cotton swab) เกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.03 - 0.3 (จำนวนเซลล์ 10^6 CFU/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar วาง Paper disc ที่หยดสารสกัด และ Paper disc ชุดควบคุมลงบนอาหารที่ป้ายเชื้อ (Swab) และนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการทดสอบจะทำ 3 ซ้ำ ตรวจผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ Paper disc ด้วย

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าวของสารสกัด

2.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe grisea*)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe grisea*) ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ด้วยวิธีทดสอบคือ Fluorometric method ; 5(6)-Carboxyfluorescene diacetate (CFDA) assay ดัดแปลงตามวิธีของ Haugland (2002) โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *Magnaporthe grisea* มาเติมลงในจานหลุมทดลอง (384 well plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimum Salt Medium (MM) โดยเติมปริมาณ $1x10^5$ spores/25 µl/well ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดทดสอบที่ละลายด้วย 0.5% DMSO ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตามด้วย CFDA ความเข้มข้น 0.65 mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใน 70% DMSO จากนั้นบ่มจานหลุมเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำและซับ

ด้วยกระดาษให้แห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสง (Fluorescent) ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และ 535 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5) เปอร์เซนต์การยับยั้งการงอกของสปอร์คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \{1 - (FU_T/FU_C)\} \times 100$$

โดยที่ FU_T คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from treated)

FU_C คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่ไม่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from untreated

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata*

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata* ของสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล ด้วยวิธีทดสอบคือ Fluorometric method ; 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) assay โดยดัดแปลงตามวิธีของ Haugland (2002) โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *Curvularia lunata* มาเติมลงในจานหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimum Salt Medium (MM) โดยเติมปริมาณ 1.4×10^5 spores/ml ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดที่ทดสอบที่ละลายด้วย 0.5% DMSO ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารผสมระหว่าง Glycerol, 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) ใน 70% DMSO โดยเติมปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำถาดหลุมไปตั้งในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำและซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และ 535 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5) เปอร์เซนต์การยับยั้งการงอกของสปอร์คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \{1 - (FU_T/FU_C)\} \times 100$$

โดยที่ FU_T คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from treated)

FU_C คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่ไม่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from untreated

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ต่อมะเร็งในช่องปาก (KB-oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-small- cell lung cancer) วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง ใช้วิธี Resazurin microplate assay (REMA) ดัดแปลงตามวิธีของ Brien *et al.* (2000) โดยนำ Cell line ของมะเร็งแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงและเจือจางให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2.2×10^4 cells/ml สำหรับมะเร็งในช่องปาก เท่ากับ 3.3×10^4 cells/ml สำหรับมะเร็งเต้านม และ 6.6×10^4 cells/ml สำหรับมะเร็งปอด นำเซลล์มะเร็งดังกล่าวพร้อมกับสารสกัดทดสอบที่ละลายด้วย 5% DMSO ให้มีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในจานหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วันสำหรับเซลล์มะเร็งในช่องปากและมะเร็งเต้านม และเป็นเวลา 5 วันสำหรับเซลล์มะเร็งปอดเมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5) ที่ความยาวคลื่น 530

นาโนเมตร และ 590 นาโนเมตร เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์คำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \{1 - (FU_T/FU_C)\} \times 100$$

โดยที่ FU_T คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from treated)

FU_C คือ ค่าการเรืองแสงของตัวอย่างที่ไม่มีสารสกัดทดสอบ (Fluorescent unit from untreated)

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

1. ผลการศึกษาสารสกัดหยาบขั้นต้น

จากการนำดอกเห็ดอูดิมานมาสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลให้ % yield สูงสุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ โดยมี % yield ของสารสกัดหยาบเท่ากับ 45.61, 14.48 และ 3.00 w/w ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพ และร้อยละของสารสกัดหยาบเห็ดอูดิมาน

ชนิดของตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบ	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (กรัม)	ร้อยละของสารสกัดหยาบ (% yield)
เฮกเซน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	3.86	14.48
เอทิลอะซิเตท	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	0.80	3.00
เมทานอล	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีเกล็ด	12.16	45.61

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืช และฤทธิ์ต้านมะเร็ง

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ

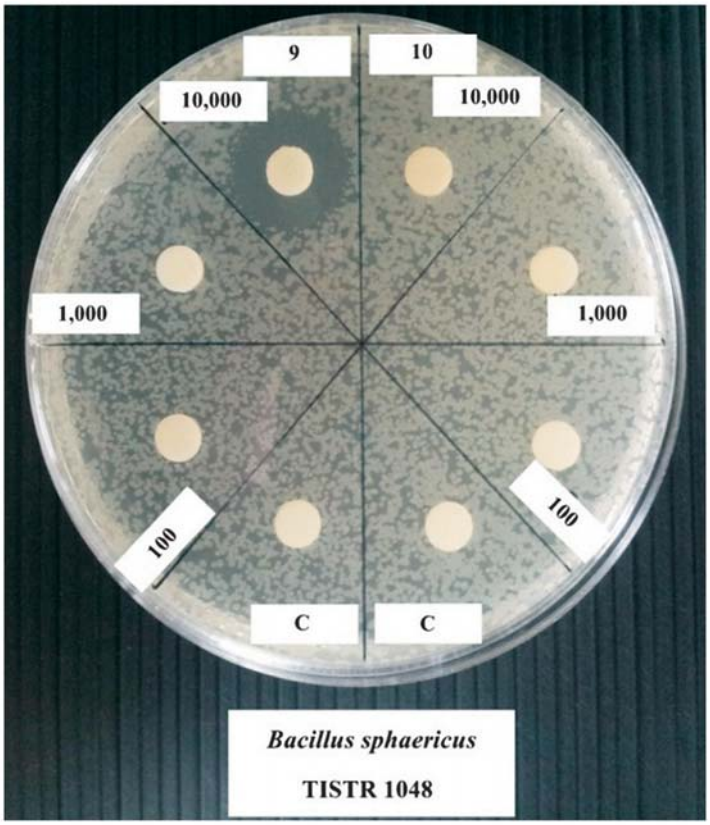
เมื่อนำสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus sphaericus* TISTR 1048, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Serratia marcescens* TISTR 1354 และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* TISTR 1048 ได้ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 10,000 ppm โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งประมาณ 12.75 ± 2.07 มิลลิเมตร ส่วนความเข้มข้นของสกัดที่ระดับต่ำกว่านี้ (1,000 ppm) ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งการยับยั้งเชื้อเป็นแบบขึ้นกับปริมาณสาร (Dose-dependent) ส่วนสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) ซึ่งจากการที่สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้สอดคล้องกับรายงานของ Cowan (1999) ได้รายงานว่าสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่จะไม่ละลายน้ำ และจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ ส่วน Khatun (2012) รายงานว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในสารสกัดจากเห็ด ได้แก่ สารกลุ่ม Terpenes, Lectins และ Polysaccharides เป็นต้น ซึ่งจะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย จากการทดลองนี้ที่สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบนั้น เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบที่ได้จากการทดลองนี้ น่าจะเป็นสารประเภทที่ไม่มีขั้ว จากการนำสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน มาทำการทดสอบกลุ่มสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลาย 20% CH_2Cl_2 : Hexane พบว่าให้ Spot สารสีม่วง กับ Anisalaldehyde reagent ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สุรางค์รัตน์

แดงจิระ (2558) ที่ได้รายงานว่าการทดสอบกลุ่มสาร Terpenes ด้วยน้ำยา Anisalaldehyde sulfuric acid ให้แถบสีม่วง ม่วงแดง ดังนั้นจากการทดสอบนี้สามารถวิเคราะห์ได้ว่า สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนนี้ประกอบด้วยกลุ่มสาร Terpenes เป็นหลัก แต่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันชนิดสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนต่อไป ส่วน Vahadi (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ของสารสกัดจาก *Oudemansiella* sp. พบว่ามีเพียงสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ส่วน Sheena *et al.* (2003) รายงานว่าสารสกัดในเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma lucidum, Navesporus floccose* และ *Phellinus rimosus* มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และสารสกัดประกอบไปด้วยสาร Triterpenes กว่า 120 ชนิด และยังประกอบไปด้วยสาร Polysaccharides, Proteins และสาร Bioactive compounds อื่นๆ ส่วน Sivakumar *et al*. (2006) รายงานว่าสารสกัดจากเห็ด *Osmoporus odoratus* ในตัวทำละลาย Petroleum ether, Chloroform, Acetone และน้ำมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่ง *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะและโรคติดเชื้ออื่นๆ *E. coli* มีความสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูง ซึ่งเป็นปัญหามากขึ้นเนื่องจากมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างมากมายทั้งในคน และใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญในอาหารสัตว์ ดังนั้นการหาสารที่มีผลต่อการยับยั้ง *E. coli* จึงมีความสำคัญ แต่ในการทดลองนี้สารสกัดหยาบไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* อาจเนื่องจากเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อนกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2541) ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์สองชั้นและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีโครงสร้างที่ไม่สมมาตรโดยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในเป็นสารฟอสโฟไลปิด ในขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) โครงสร้างที่ไม่สมมาตรดังกล่าว ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีประโยชน์ในการช่วยปกป้องเซลล์

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเห็ดอูดิมาน

สารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลาย	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ ± SD (มม.)			
	B. sphaericus TISTR 1048	*P. aeruginosa* TISTR 781	*S. marcescens* TISTR 1354	*E. coli*
เฮกเซน	12.75±2.07	NA	NA	NA
เอทิลอะซิเตท	NA	NA	NA	NA
เมทานอล	NA	NA	NA	NA

*NA = No activity



ภาพที่ 2 บริเวณการยับยั้งเชื้อ *B. sphaericus* TISTR 1048 ของสารสกัดหยาบเห็ดอูดิมาน ชั้นตัวทำละลายเฮกเซน (หมายเลข 9 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ 10,000 ppm)

2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าวของสารสกัดหยาบ

เชื้อราโรคใบไหม้ของข้าวนั้นมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวในประเทศไทย และประเทศผู้ผลิตข้าวอื่นๆ ทั่วโลก ในการทดลองนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคไหม้ของข้าว *Magnaporthe grisea* และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata* พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนสามารถยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของข้าว *Magnaporthe grisea* โดยมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเท่ากับ 97.83 (ตารางที่ 3) นับได้ว่ามีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราค่อนข้างสูง สอดคล้องกับรายงานของ Ohkawa (2007) ที่พบว่าสาร Strobilurins เป็นสารปฏิชีวนะธรรมชาติที่สังเคราะห์มาจากเห็ด *Oudemansiella* sp. ที่เจริญบนตอไม้ผุ โดยสาร Strobilurins ที่สร้างขึ้นมามีหน้าที่ปกป้องตัวเองจากพวกรา นอกจากนี้ยังมีรายงานที่พบว่าสารสกัดจาก *Oudemansiella* sp. มีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคพืชหลายชนิดในระดับที่สูง (Anke, 1995; Rosa *et al*, 2004) จากการที่สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซนมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบนั้น แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์สำคัญจากสารสกัดหยาบเป็นกลุ่มสารที่ไม่มีขั้ว แต่จะเป็นสารชนิดใดควรจะต้องมีการศึกษาชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ต่อไป เพื่อจะสามารถพัฒนาสารสกัดจาก *Oudemansiella canarii* ให้มีศักยภาพเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อราโรคใบไหม้ข้าว (*Magnaporthe grisea*) ได้ เนื่องจากมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราค่อนข้างสูง ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata* พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata*

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคข้าว และฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบเห็ดอูดิมานในชั้นตัวทำละลายต่างๆ

	% การยับยั้งของสารสกัดในแต่ละชั้นตัวทำละลาย		
	เฮกเซน	**เอทิลอะซิเตท**	**เมทานอล**
1. Anti-rice blast disease fungi (*Magnaportha grisea*)	97.83	NA	NA
2. Anti-dirty panicle disease fungi (*Curvularia lunata*)	NA	NA	NA
3. Anti-Cancer (KB-Oral cavity cancer)	NA	NA	NA
4. Anti-Cancer (MCF7-breast cancer)	NA	NA	NA
5. Anti-Cancer (NCI-H187-small cell lung cancer)	NA	NA	NA

* NA = No Activity

2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ต่อมะเร็งในช่องปาก (KB-oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-small- cell lung cancer) พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 3) ได้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดที่ได้จากเห็ด *Oudemansiella* sp. ได้แก่ การศึกษาของ Anke (1997) ที่รายงานว่าสาร Odemansins มีฤทธิ์ต้านทั้ง Human cell lines และ Animal cell lines ที่สกัดได้จาก *Oudemansiella canarii* ส่วนรายงานของ Rosa และคณะ (2005) ที่ได้ศึกษาสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทจากส่วน Mycelium ของ *Oudemansiella canarii* ที่เลี้ยงในอาหาร Malt extract พบว่าสาร Odemansin-A ที่สกัดได้จาก *Oudemansiella canarii* แสดงฤทธิ์ต้าน Cancer cell lines ในระดับที่ต่ำและพบว่าสาร Odemansin-A ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ แต่มีฤทธิ์ที่น้อยกว่าสารสกัดหยาบของ *Oudemansiella canarii* เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง UACC-62 (Melanoma), MCF-7 (Mammary) และ Tk-10 (Kidney) ซึ่งได้สันนิษฐานว่าน่าจะมีสารออกฤทธิ์ชนิดอื่นที่เสริมฤทธิ์กันในสารสกัดหยาบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนในการวิจัยนี้ที่ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัด อาจมีสาเหตุมาจากแหล่งวัตถุดิบที่แตกต่างกัน และเป็นการทดสอบใน cell line ของมะเร็งที่ต่างชนิดกัน เป็นต้น หรือควรมีการศึกษาเปรียบเทียบเพิ่มเติม

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดสารจากเห็ดอูดิมานด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ได้นำสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus sphaericus* TISTR 1048, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Serratia marcescens* TISTR 1354 และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus sphaericus* โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง 12.75 ± 2.07 มิลลิเมตร

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคไหม้ของข้าว (*Magnaporthe grisea*) และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโรคเมล็ดด่างของข้าว *Curvularia lunata* พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งเชื้อราโรคไหม้ของข้าว *Magnaporthe grisea* โดยมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเท่ากับ 97.83 ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเห็ดอูดิมานนี้มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อราโรคใบไหม้ข้าวได้

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ต่อมะเร็งในช่องปาก (KB-oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-

breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-small-cell lung cancer) พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้ง 3 ชนิด

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเบื้องต้น ควรมีการศึกษาถึงการแยกสารบริสุทธิ์ และศึกษาชนิดของสารที่ออกฤทธิ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2550). **จุลชีววิทยาทั่วไป.** (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ. (2558). **องค์ประกอบทางเคมี การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม**. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาเคมีศึกษา. มหาวิทยาลัยบูรพา.

อรพิน เกิดชูชื่น ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และมณฑกาญจน์ ชนะภัย. (2553). คุณลักษณะสารสกัดจากพืชวงศ์ Apiaceae และ Piperaceae จำนวน 4 ชนิด**. วารสารวิจัย มสด สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 3(1), 35 - 44.

อัจฉรา พยัพพานนท์. (2545). เห็ดสกุล *Oudemansiella* จะเป็นเห็ดพาณิชย์. **วารสารเห็ดไทย**, 20(1), 45 - 55.

อัจฉรา พยัพพานนท์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และอุทัยวรรณ แสงวณิช. (2555). การรวบรวบและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ด *Oudemansiella* spp. จากแหล่งต่างๆ เพื่อเป็นพันธุ์ทางการค้า. **วารสารเห็ดไทย**, 30(1), 5 - 13.

Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2003). Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus Phellinus rimosus (Berk) Pilat, **Journal Ethnopharmacol**, 84(2-3), 157 - 162.

Anke, T., Besl, H., Mocek, U., Steglich, W. (1983). Antibiotics from basidiomycetes. XVIII. Strobilurin C and oudemansin B, two new antifungal metabolites from Xerula species (Agaricales). **J. Antibiot (Tokyo)**, 36(6), 661 - 666.

Anke, T. (1995). The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal of Botany**, 73(1), 940 - 945.

Anke, T. (1997). **Strobilurins.** Fungal Biotechnology. London: Chapman & Hall.

Bezivin, C., Delcros, J. G., Fortin, H., Amoros, M., & Boustie, J. (2003). Toxicity and antitumor activity of a crude extract from Lepista inversa (Scop. Fr.) Pat. (Agaricomycetideae): A preliminary study. **Int. Journal Medicine Mushrooms**, 5(1), 25 - 30.

Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (1999). Mushrooms, tumors and immunity. **Biology Medicine**, 221(4), 281 - 293.

Brien, J. O., Wilson, I., Ortho, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of tha alamar blue (resazurin) fluorescent dry for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, 267(17), 5421 - 5426.

Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). **Nutritional value, Medicinal effect, and Environmental impact**. (2nd edition). CRC Press.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiol. Rev.,** 12(4), 564 - 582.

Denisova, N. P. (2001). Traditional of using medicinal mushroom in different nations. **Journal of Medicine Mushroom,** 3(4), 409 - 415.

Fan, I., Pan, H., Soccol, A. T., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2006). Advances in mushroom research in last decade. **Food Technol. Biotechnology**, 44(3), 303 - 311.

Haugland, R. P. (2002). **Handbook of fluorescent probes and research products**. Oregon, USA: Molecular Probes, Inc.

Jose, N., Ajith, T. A., & Janardhanan, K. K. (2002). Antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of culinary medicinal mushroom Pleurotus pulmonarius (Fr.) Quel. (Agaricomyce tideae). **Journal of Medicine Mushroom**, 4(4), 329 - 335.

Khatun, S., Islam, A., Cakilcioglu, U., & Chatterjee, N. C. (2012). Research on mushroom as a potential source of nutraceuticals: A review on indian perspective. **American Journal of Experimental Agriculture**, 2(1), 47 - 73.

Luiz, H. R., Betania, B. C., Katia M. G., Carlos, A. R., & Carlos, L. Z. (2005). Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomyco ta) World. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21(6), 983 - 987.

Ohno, N., Miura, N., Nakajima, M., & Yadomae, T. (2000). Antitumor 1, 3-b-glucan from cultured fruit body of Sparassis crispa. **Biol. Pharm. Bull.,** 23(7), 866 - 872.

Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahaonen, M., Kujala, T., et al. (2000). Antimicrobial effects of finished plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **Int J. Food Microbiol**, 56(1), 3 - 12.

Reshetnikos, S. V., Wasser, S. P., & Ton, K. K. (2001). Higher basidiomycota as a source of antitumor and immuno stimulation polysaccharides (Review). **Int. Journal of Medicine Mushroom,** 3(4), 361 - 394.

Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., & Zani, C. L. (2003). Screening of Brazillian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98(7), 967 - 974.

Rosa, L. H., Cota, B. B., Machado, K., Rosa, C. A., & Zani, C. L. (2005). Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomy cota). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21(6), 983 - 987.

Sivakumar, R., Vetrichelvan, T., Rajendran, N. N., Devi, M. I., Sundaramoorthi, K., Shankar, A. S. K., & Shanmugam, S. (2006). Antibacterial activity of mushroom. **Osmoporus odoratus**, 68(4), 523 - 524.

Vahidi, H., & Namjoyan, F. (2004). Evaluation of antimicrobial activity of *Oudemansiella* sp. (Basidiomycetes). Iranian **Journal of Pharmaceutical Research,** 3(2), 115 - 117.

Zou, X. (2005). Optimization of nutritional factors for exopolysaccharide production by submerged cultivation of the medicinal mushroom *Oudemansiella radicata*. **World J. Microbial Biotechnol**, 21(6), 1267 - 1271.