# สารสกัดจากเห็ดและประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา สาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียบางชนิด

# Mushrooms extract and their efficiency to inhibit some plant pathogenic fungi and bacteria

**เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์[1*], ภัสรา นวะบุศย์[1] และ พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์[1]**

**Yaovapa Aramsirirujiwet[1*], Patsara Nawabut[1] and Poonpilai Suwanarit[1]**

**บทคัดย่อ**: การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียบางชนิด โดยใช้เห็ดทางการค้าและเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ ได้แก่ เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. sajor-caju*) เห็ดนางนวลสีชมพู (*P. djamor*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เห็ดตับเต่า (*Boletus* sp.) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดออรินจิ (*P. eryngii*) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas*) และเห็ดไม่ทราบชนิด โดยใช้ น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และเฮกเซน เป็นตัวทำละลาย ทำการสกัดด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศและเก็บสารสกัดจากเห็ดที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria brassicicola, Colletotrichum gloeosporioides, Sclerotium rolfsii* และ *Pythium* sp. และแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli , Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata*, *A. brassicicola* และ *C. gleosporioides* ได้ดี โดยค่าความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* , *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* มีค่าน้อยกว่า 1.563 มก./มล. ส่วนสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยอะซิโตนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีค่า MIC น้อยกว่า 170 มก./มล. และสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตน และสารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* มีค่า MIC น้อยกว่า 170, 190, 170 และ 150 มก./มล. ตามลำดับ ผลการทำทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟีพบว่า สารสำคัญที่พบในสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ คือ สาร Protocatechuic acid

**คำสำคัญ**: สารสกัดจากเห็ด, เชื้อราสาเหตุโรคพืช, แบคทีเรียก่อโรค, ทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟี, โปรโตคาทีชูอิค แอซิด

**ABSTRACT:** In this study, the efficiency of the mushrooms extract to inhibit some plant pathogenic fungi and some bacteria was carried out. The fruiting body of mushrooms were extracted from both commercial and natural mushrooms such as; *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. djamor*, *P. cystidiosus*, *Boletus* sp., *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum*, *P. eryngii*, *Lentinus squarrosulas* Mont. and Unknown. Water, ethanol, acetone and hexane were used as solvent. The extraction was done with Rotary evaporator and kept the extracts at 4 ºC. Six plant pathogenic fungi; *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium* sp. and three bacteria; *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* were used for antimicrobial test. Result showed that the water and ethanol extract of *P. eryngii* could inhibited the growth of *C. lunata*, *A. brassicicola* and *C. gleosporioides*. The minimum inhibitory concentration (MIC) value of mushrooms extracted with ethanol to *C. lunata* , *A. brassicicola* and *C. gleosporioides* were less than 1.563 mg/ml.

[1] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author: fsciypt@ku.ac.th

The acetone extract of *P. ostreatus* could inhibited the growth of *E. coli* with MIC value less than 170 mg/ml. The water extract of *P. ostreatus*, the ethanol and acetone extract of Unknown and the ethanol extract of *Boletus* sp. could inhibited the growth of *B. cereus* with MIC value less than 170,190,170 and 150 mg/ml, respectively. Thin layer chromatography method was done and indicated that the important compound in the extract which could inhibited the plant pathogenic fungal growth was protocatechuic acid.
**Keywords:** mushrooms extract, plant pathogenic fungi, pathogenic bacteria, Thin layer chromatography, Protocatechuic acid

## บทนำ

จากรายงานการวิจัยในเห็ดหลายๆ ชนิด แสดงให้เห็นว่านอกจากการเป็นอาหารแล้ว เห็ดยังมีประโยชน์ในด้านการแพทย์ เช่น มีสารที่ออกฤทธิ์ทางยา ใช้รักษาและป้องกันการเป็นมะเร็ง และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด จากรายงานของ Guler et al. (2009) ที่ทำการศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr) Karst และ *Lactarius vellereus* (Pers.) ที่สกัดด้วยเอทานอล และ คลอโรฟอร์ม พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium inflexum* และ *F. heterosporium* ได้ Nunboon et al. (2010) ศึกษาการใช้สารสกัดจากสมุนไพรและเห็ดที่กินได้ในการควบคุมโรคใบจุดของกะหล่ำปลี ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* พบว่า สารสกัดจากเห็ดนางรม เห็ดกระด้าง และเห็ดขอนขาว ที่สกัดด้วยน้ำ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และ เฮกเซน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ได้ Jonathan and Awotona (2010) ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์จากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma* species) ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และ น้ำ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Candida albicans, Pachy dermatitis, Malassezia sloffiae, Malassezia sympodialis, Aspergillus niger, A. flavus, A. tamarii* และ *F. oxysporum* บนอาหาร Saboraud dextrose agar ได้ Turkoglu et al. (2011) ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากเห็ด *Clitocybe odora* ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และ อะซิโตน พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *F. culmorum* และ *F. moniliforme* บนอารหาร PDA ได้ และรายงานของ Balakumar et al. (2011) รายงานการใช้สารสกัดจากเห็ด *Phellinus* sp. ที่สกัดด้วยน้ำ และ เมทานอล ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *Penicillium* sp., *A. niger*, *A. flavus, Mucor indicus*, และยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน Mondal (2013) ทำการศึกษาสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus ostreatus, P. sajor-caju, Ganoderma lucidum* และ *Agaricus bisporus* ที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และอะซิโตน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. candidus, Penicillium patulum* และ *Rhizopus stolonifer* บนอาหาร PDA ได้

จากคุณสมบัติดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าเห็ดทั้งที่มีขายในท้องตลาดและเห็ดในธรรมชาติอีกหลายชนิดก็น่าจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียบางชนิด การวิจัยนี้ได้ทดลองนำเห็ดรับประทานได้และเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ มาสกัดสารสกัดจากเห็ด ด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น น้ำกลั่น เอทานอล อะซิโตน และเฮกเซน เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียบางชนิดในระดับห้องปฏิบัติการ หาความเสถียรของสารสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ทดสอบระยะเวลาการออกฤทธิ์ หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย และแยกสารสกัดด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟีเพื่อศึกษาสารสำคัญในสารสกัดนั้น ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปประยุกต์ใช้

## วิธีการศึกษา

ตัวอย่างเห็ดที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เห็ดที่รับประทานได้และเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ ดอกเห็ดสดที่รับประทานได้ ได้รับความอนุเคราะห์ จากกระท่อมเห็ด ฟาร์ม อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี หรือซื้อจากตลาดสด ส่วนเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติ เก็บได้จากเห็ดที่เจริญในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หรือบริเวณเขตจตุจักร นำดอกเห็ดแช่ตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:1 กรณีของตัวทำละลายเอทานอล อะซิโตน หรือเฮกเซน และอัตราส่วน 1:3 ในกรณีของน้ำกลั่น แช่นาน 7 วัน ที่ 4 ºC จากนั้นกรองแล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50-60 °C โดยใช้ 5% DMSO เป็นตัวชะ เก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 °C นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด คือ *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium* sp.และ *Sclerotium rolfsii* และแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* , *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี disc diffusion กรณีของแบคทีเรีย เตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ Mc Faland Standard No 0.5 แล้วทำการป้าย (swab) แบคทีเรียบนอาหาร nutrient agar (NA) ในกรณีของเชื้อรา ผสมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อราทดสอบ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีอุณหภูมิ 45-50°C เพื่อให้ได้ความเข้มข้น $10^6$-$10^8$ CFU/ml ก่อนเทลงจานทดสอบ รอให้อาหารแข็ง จากนั้นชุบกระดาษตาปลาด้วยสารสกัดจากเห็ดที่ต้องการทดสอบ และวางลงบนอาหาร NAที่มีเชื้อแบคทีเรีย และ PDA ที่มีเชื้อราสาเหตุโรคพืช ที่เทไว้ใช้จานอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียหรือเชื้อราสาเหตุโรคพืชอย่างเดียวเป็นจานควบคุม ทำจำนวน 3 ซ้ำ และใช้ 5% DMSO เป็น negative control สังเกตบริเวณการยับยั้งรอบๆ แผ่นกระดาษตาปลา คัดเลือกเฉพาะสารสกัดจากเห็ดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือแบคทีเรีย ไปทดสอบหาความเสถียรของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือแบคทีเรีย เมื่อนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C, 25°C, 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละสารสกัด โดย Duncan"s multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทดสอบระยะเวลาการออกฤทธิ์ โดยทดสอบซ้ำทุกๆ 1 เดือน นับจากวันที่สกัดสารและจนกว่าจะหมดฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ โดยทดสอบด้วยวิธีเดียวกับการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย ทดสอบหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) โดยทำการเจือจางสารสกัดแบบลดลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) โดยเริ่มจาก 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 และตรวจหาสารสำคัญในสารสกัดโดยวิธี TLC โดยใช้ Cinnamic acid, Vanillic acid และ Protocatechuic acid เป็นสารมาตรฐาน โดยใช้ตัวทำละลาย chroloform:methanol:acetic acid ในอัตราส่วน 18:2:0.2 ตรวจผลภายใต้แสงยูวี

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### การเก็บตัวอย่าง

สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดได้ทั้งสิ้น 11 ชนิด ประกอบด้วย เห็ดจากธรรมชาติ 2 ชนิด คือ เห็ดไม่ทราบชนิด และเห็ดขอนขาว ส่วนเห็ดทางการค้าชนิดรับประทานได้ 9 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์ จากกระท่อมเห็ด ฟาร์ม อ.บางบัวทอง จ.นนทบุรี 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางนวล สีชมพู และเห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดที่ซื้อจากตลาดสด 5 ชนิด ได้แก่ เห็ดออรินจิ เห็ดหลินจือ เห็ดตับเต่า เห็ดฟาง และเห็ดแครง

**การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย**

ในกรณีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชพบว่า มีเพียงสารสกัดจากดอกเห็ดออรินจิ *(P. eryngii)* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata*, *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* โดยสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่น พบบริเวณการยับยั้งเชื้อรากว้าง 11.00±0.26, 11.00±0.20 และ 14.53±0.15 มม. ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata*, *A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* พบบริเวณการยับยั้งเชื้อรากว้าง 39.00±1.00, 43.17±0.76 และ 58.50±1.80 มม. ตามลำดับ (Table 1) ผลการทดลองที่ได้ มีความสอดคล้องกับรายงานของ Chen (2010) นำส่วนใสของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเส้นใยเห็ดออรินจิมาทดสอบการยับยั้งการเจริยของเชื้อรา พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA ได้

ในกรณีของแบคทีเรียพบว่า สารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้มากที่สุด วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 10.20±0.30 มม. สารสกัดจากดอกเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 9.03±1.03 มม. สารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิดที่สกัดด้วยอะซิโตน และเอทานอล มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 7.50±0.50 และ 7.33 ±0.58 มม. ตามลำดับ สารสกัดจากดอกเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 7.23±0.45 มม. จากผลการทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่ารายงานของ Nwachukwu and Uzoeto (2010) ที่ได้ทำการสกัดเห็ดตระกูลนางรม *Pleurotus* sp. ด้วยน้ำเปล่า และทดสอบการยับยั้งการเจริญกับเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S. aureus* บนอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 6.01 และ 0.86 มม. ส่วนสารสกัดจากดอกเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยอะซิโตน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้แต่โคโลนีมีลักษณะจางมาก จนไม่สามารถวัดบริเวณการยับยั้งที่แน่นอนได้ (Table 2) สารสกัดทั้งหมดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียจะนำไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

Table 1 The mushroom extract could inhibited the growth of some plant pathogenic fungi (show only positive result)

| Mushroom | Solvent | Inhibition Zone (mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fungi | | | | | |
| | | *F. oxysporum* | *S. rolfsii* | *C. lunata* | *Pythium* sp. | *C. gloeosporioides* | *A. brassicicola* |
| *P. eryngii* | Water | x | x | 11.00±0.26$^{e}$ | x | 14.53±0.15$^{d}$ | 11.00±0.20$^{e}$ |
| | Ethanol | x | x | 39.00±1.00$^{c}$ | x | 58.50±1.80$^{a}$ | 43.17±0.76$^{b}$ |

Mean±SD in the table with different letters are significant difference (P<0.05)

X: not inhibited

Table 2 The mushroom extract could inhibited the growth of some pathogenic bacteria (show only positive result)

| Mushroom | Solvent | Inhibition Zone (mm) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Bacteria | | |
| | | *E. coli* | *B. cereus* | *S. aureus* |
| *P. ostreatus* | water | x | 9.03±1.03[b] | 7.23±0.45[c] |
| Unknown | ethanol | x | 7.33 ±0.58[c] | x |
| | acetone | x | 7.50±0.50[c] | x |
| *Boletus* sp. | ethanol | x | 10.20±0.30[a] | x |
| *P. ostreatus* | acetone | * | * | * |

Mean±SD in the table with different letters are significant difference (P<0.05)

X: not inhibited * = inhibition zone presented but very pale

**การทดสอบความเสถียรของสารสกัดที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย**

ในเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า เมื่อนำสารสกัดไปไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที และนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล เมื่อทดสอบที่ 4°C สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata* ได้ดีที่สุด โดยวัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 41.17±1.76 มม. และสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมื่อทดสอบที่ 4 และ100 °C พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญได้ดีไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 11.17±0.76 และ 11.50±2.29 มม. ตามลำดับ ในกรณีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล มีการยับยั้งแตกต่างกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ และกรณีของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่าสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล พบบริเวณการยับยั้งกว้างที่สุด 38.33±2.89 มม. เมื่อทดสอบที่ 4 °C และสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เมื่อทดสอบที่ 4 และ 100 °C สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ดีไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วัดบริเวณการยับยั้งได้กว้าง 9.67±0.76 และ 9.67±029 มม. ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 The stability test of mushroom extract (*Pleurotus eryngii*) to inhibited some plant pathogenic fungi at various temperature

| Mushroom | Solvent | Fungi | Inhibition Zone (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4°C | 25°C | 60°C | 100°C |
| *P. eryngii* | water | *C. lunata* | 11.17±0.76[a] | 8.83±1.60[ab] | 7.83±1.44[b] | 11.50±2.29[a] |
| | water | *C. gloeosporioides* | 9.67±1.61[a] | 9.83±1.26[a] | 9.50±1.32[a] | 9.67±1.44[a] |
| | water | *A. brassicicola* | 9.67±0.76[a] | 8.33±0.76[b] | 9.33±029[ab] | 9.67±029[a] |
| | ethanol | *C. lunata* | 41.17±1.76[a] | 20.5±3.90[b] | 24.5±3.77[b] | 21.83±4.25[b] |
| | ethanol | *C. gloeosporioides* | 37.50±2.78[a] | 30.33±3.33[a] | 31.17±2.37[a] | 33.83±5.69[a] |
| | ethanol | *A. brassicicola* | 38.33±2.89[a] | 25.33±6.51[b] | 20.33±0.58[b] | 19.33±1.53[b] |

Mean±SD in the row with different letters are significant difference (P<0.05)

ในแบคทีเรียพบว่า เมื่อบ่มที่ 4, 25, 60 และ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที สารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีในทุกอุณหภูมิ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดี

ที่สุดที่ 4°C สารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอลยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีที่ 4 และ 25°C โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตน ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ดีในทุกอุณภูมิที่ทดสอบ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเพียงสารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* เมื่อบ่มที่ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ส่วนสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยอะซิโตน เมื่อทดสอบที่ 4, 25, 60 และ 100 °C มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* แต่โคโลนีมีลักษณะจางมากจนไม่สามารถวัดโซนการยับยั้งที่แน่นอนได้ (Table 4)

**Table 4** The stability test of mushroom extract to inhibited some bacteria at various temperature

| Mushroom | Solvent | Bacteria strain | Inhibition Zone (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4°C | 25°C | 60°C | 100°C |
| *P. ostreatus* | water | *B. cereus* | 7.33±1.26[a] | 8.00±0.50[a] | 6.93±0.81[a] | 7.80±0.20[a] |
| *P. ostreatus* | water | *S. aureus* | 8.00±0.50[a] | 7.33±0.29[ab] | 6.63±0.15[b] | 7.17±0.57[b] |
| *P. ostreatus* | acetone | *E. coli* | * | * | * | * |
| Unknown | ethanol | *B. cereus* | 7.17±1.26[a] | 7.17±0.29[a] | 8.00±0.46[a] | x |
| Unknown | acetone | *B. cereus* | 6.67±0.58[a] | 7.00±0.00[a] | 7.17±0.58[a] | 6.75±0.43[a] |
| *Boletus* sp. | ethanol | *B. cereus* | 10.20±0.30[a] | 10.17±0.25[a] | 9.25±0.0[b] | 8.33±0.15[c] |

Mean±SD in the row with different letters are significant difference (P<0.05)

x = no inhibition zone presented * = inhibition zone presented but very pale

จากผลการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล ที่ทดสอบกับเชื้อรา *C. lunata* และ *A. brassicicola* สารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิดที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจะมีประสิทธิภาพลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Diker et al. (1991) ที่รายงานว่า ผลของการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเห็ดจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 50 °C เป็น 100°C อีกทั้งสารสำคัญในการต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดจากเห็ดมีหลายชนิด บางชนิดอาจสลายเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kopjar et al. (2009) ที่ทำการศึกษาการสลายตัวของสารฟีนอลลิกจากน้ำเรดเคอร์เร้น ที่อุณหภูมิ 30, 50, 70 และ 90 °C ที่พบว่า สารฟีนอลลิกสลายตัวน้อยที่สุดที่ 30 °C และจะสลายตัวเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และ Volf et al. (2014) ได้ศึกษาความเสถียรของสารพวกฟีนอลที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 °C พบว่า สารจะเสียสภาพ 15% ที่ 60 °C และจะเสียสภาพเพิ่มขึ้นเป็น 25% และ 37% ที่ 80 และ 100 °C ตามลำดับ และจากผลการทดลองจะเห็นว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่นในทุกๆ อุณหภูมิที่ทดสอบ อีกทั้งสารสกัดจากเห็ดส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียได้ดี ที่ 4°C จึงสรุปได้ว่า การเก็บสารสกัดที่ 4 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารสกัด เพื่อไม่ให้เสียสภาพ และยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียอยู่

การทดสอบระยะเวลาการออกฤทธิ์ของสารสกัด พบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำกลั่น มีระยะเวลาการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช นาน 9 เดือน นับจากวันสกัดจากการตรวจสอบทุกๆ 1 เดือน โดยเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ส่วนสารสกัดจากเห็ดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีระยะเวลาออกฤทธิ์นาน

9 เดือน สารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยอะซิโตนที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* มีระยะเวลาออกฤทธิ์นาน 12 เดือน สารสกัดจากดอกเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอลที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* มีระยะเวลาออกฤทธิ์นาน 13 เดือน สารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล และอะซิโตน ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* มีระยะเวลาออกฤทธิ์ 14 เดือน และสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* มีระยะเวลาออกฤทธิ์นานที่สุด คือ 21 เดือน

**ค่าความเข้มข้นต่ำสุด** (Minimum Inhibitory Concentration) **ของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย**

จากการทดลองพบว่า ค่า MIC ของสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีค่าน้อยกว่า 9.375 มก./มล. (1:8) และค่า MIC ของสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยด้วยเอทานอล ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. lunata*, *C. gloeosporioides* และ *A. brassicicola* มีค่าน้อยกว่า 1.563 มก./มล. (1:16) (Figure 1) จากผลการทดลอง สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล มีค่า MIC น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Johnny (2010) ที่เคยรายงานค่า MIC ของสารสกัดจากข่า (*Alpinia galangal* L.) ที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มและอะซิโตน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีค่าเท่ากับ 15.00 มก./มล. และ 17.50 มก./มล. ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีกว่าสารสกัดจากข่า

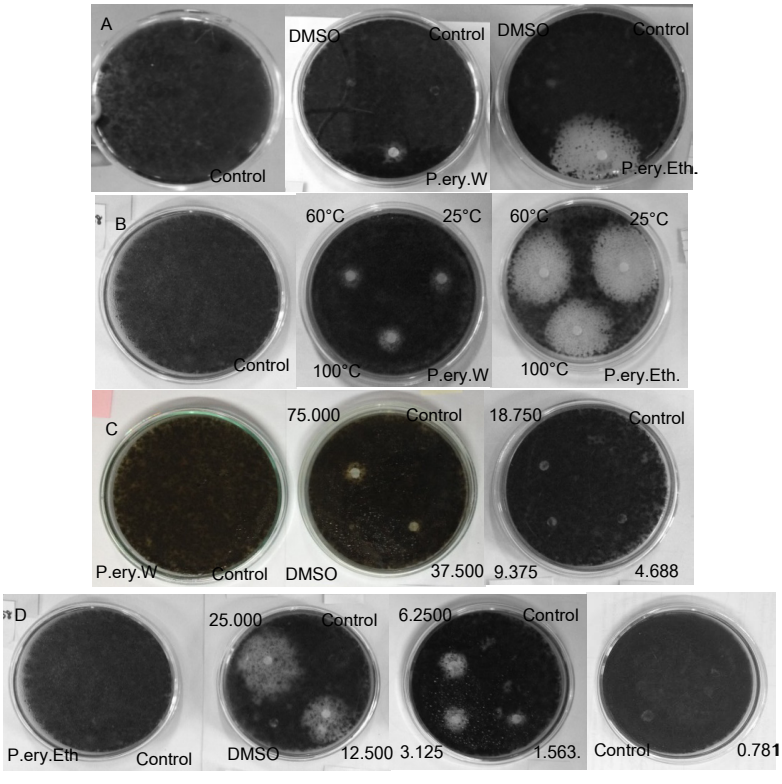


**Figure 1** The inhibitory test of water extract of *P.eryngii* (P.ery.W) and ethanol extract of *P.eryngii* (P.ery.Eth) to the growth of *Alternaria brassicicola*; A) Antifungal growth test; B) The stability test; (C) and (D) Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test (mg/ml)

ค่า MIC ต่ำที่สุดของสารสกัดจากเห็ดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบสารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าน้อยกว่า 150 มก./มล. รองลงมาได้แก่ สารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น สารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยอะซิโตน และสารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยอะซิโตน มีค่าน้อยกว่า 170 มก./มล. และสารสกัดที่มีค่า MIC สูงสุด ได้แก่ สารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าน้อยกว่า 190 มก./มล. จากผลการทดลองนี้ ค่า MIC มีค่ามากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ Nehra et al. (2012) ที่รายงานค่า MIC ของสารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าเท่ากับ 500 มก./มล. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* บนอาหาร NA และ Nwachukwu and Uzoeto (2010) รายงานค่า MIC มีค่าเท่ากับ 50 มก./มล. จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดตระกูลนางรม *Pleurotus* sp. ที่สกัดด้วยน้ำเปล่า และทดสอบการยับยั้งการเจริญกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* บนอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB)

**ผลการทดสอบด้วย** Thin layer chromatography (TLC)

ผลการนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี คือ สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล มาทดสอบด้วยวิธี TLC พบว่า ในสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล พบแถบที่ตรงกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ สาร Cinnamic acid มีค่า Rf เท่ากับ 0.61 และสาร Protocatechuic acid มีค่า Rf เท่ากับ 0.27 ส่วนสารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่น พบแต่สาร Protocatechuic acid มีค่า Rf เท่ากับ 0.27 (**Figure 2**) ซึ่งคาดว่า เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alves et al. (2013) และ Pennerman et al. (2015) ที่รายงานว่า พบสารประเภท Phenolic compound ได้แก่ สาร Cinnamic acid และสาร Protocatechuic acid ในเห็ดออรินจิ (*Pleurotus eryngii*)

เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 1 มก./มล. พบว่า สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยเอทานอล มีความเข้มข้นของสาร Protocatechuic acid มากกว่า 1 มก./มล. ในขณะที่สารสกัดจากเห็ดออรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน ซึ่งการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย น่าจะมีส่วนทำให้สกัดสารสำคัญออกมาได้ดีกว่าการใช้น้ำกลั่น จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่า

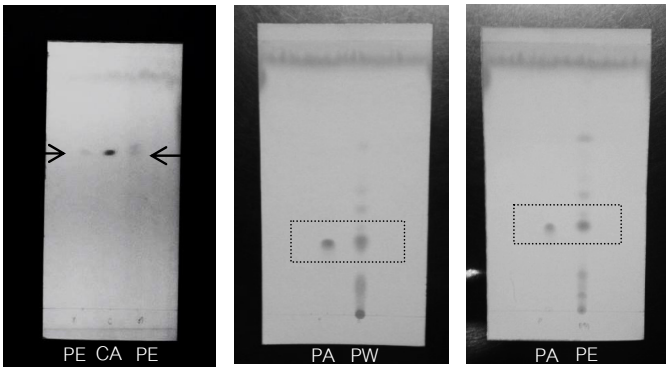


**Figure 2** TLC result from water and ethanol extract of *P.eryngii* comparing with the standard (CA and PA). CA) Cinnamic acid; PA) Protocatechuic acid; PW) *P.eryngii* water extract; PE) *P.eryngii* ethanol extract

เมื่อนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือ สารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล มาทดสอบด้วยวิธี TLC และตรวจภายใต้แสงยูวี พบว่า สารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล พบสารประกอบต่างๆ หลายสาร และมีแถบที่ตรงกับสารมาตรฐานด้วย แต่แถบยังแยกจากกันไม่ชัดเจน จึงอาจกล่าวได้ว่า ในสารสกัดจากเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเอทานอล มีสาร Protocatechuic acid เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย มีค่า Rf เท่ากับ 0.27 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Alves et al. (2013) ที่รายงานพบสาร Protocatechuic acid ในเห็ดตับเต่า (*Boletus edulis*) สารนี้มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา (Kim, 2008 และ Vaquero et al., 2007) และสารกลุ่มฟีนอลนี้จะมีฤทธิ์ในการทำลายผนังเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย มีเอนไซม์ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์ (Tiwari, 2011) จึงทำให้แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนสารสกัดจากเห็ดไม่ทราบชนิด ที่สกัดด้วยอะซิโตน และที่สกัดด้วยเอทานอล สารสกัดจากเห็ดนางรมฮังการีที่สกัดด้วยน้ำเปล่า ยังไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้ด้วยวิธี TLC ส่วนสารมาตรฐาน Vanillic acid มีรายงานว่า พบในเห็ดอรินจิ (*P. eryngii*) ( Alves et al., 2013) และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ตามรายงานของ Vaquero et al. (2007) ที่พบว่า สาร Vanillic acid สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่ไม่พบสาร Vanillic acid ในสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากการแยกสารประกอบด้วยวิธี TLC

## สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดจากเห็ดอรินจิที่สกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *C. lunata, A. brassicicola* และ *C. gloeosporioides* และสารสกัดจากเห็ดตับเต่า เห็ดไม่ทราบชนิดและเห็ดนางรมฮังการี มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สารสกัดยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดีเมื่อทดสอบที่ 4 °C และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น สารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรีย คือ สาร Cinnamic cid และ Protocatechuicnacid ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายผนังเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย มีเอนไซม์ที่มีผลยับยั้งการทำงานของเซลล์ (Tiwari, 2011) ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการใช้ประโยชน์จากเห็ดและสารสำคัญจากเห็ด เพื่อการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตรและการแพทย์ต่อไปในอนาคต

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยประจำปี 2557-2558 ในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ ผศ.ดร.อรอุมา เพียซ้าย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรคพืชเพื่อการทำวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

Alves, M.J., I.C.F.R. Ferreira, H.J.C. Froufe, R.M.V. Abreu, A. Martins, and M. Pintado. 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms SAR analysis and docking studies. J. Appl. Microbiol. 1-12.

Balakumar, R., E. Sivaprakasam, D. Kavith, S. Sridhar, and J.S. Kumar. 2011. Antibacterial and antifungal activity of fruit bodies of *Phellinus* mushroom extract. Int. J. Biosci. 1: 72-77.

Chen, J.T., and Huang J.W. 2010. Antimicrobial Activity of Edible Mushroom Culture Filtrates on Plant Pathogens. Plant Pathol. Bulletin. 19: 261-270.

Diker, K.S., M. Akan, M. Gulsenttascelik, and M. Yurdakok. 1991. Thebacteriocidal Activity of Tea against *Camplyobacter jejuni* and *Camplyobacter coli*. Appl. Microbiol. 12: 34-35.

Guler, P., I. Akata, and F. Kutluer. 2009. Antifungal activities of *Fomitopsis pinicola* (Sw.:Fr) Karst and *Lactarius vellereus* (Pers.) Afr. J. Biotech. 8: 3811-3813.

Johnny, L., U.Y. Kalsom, and R. Nulit. 2010. The effect of herbal plant extracts on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Appl. Biosci. 34: 2218- 2224.

Jonathan, S.G., and F.E. Awotona. 2010. Studies on Antimicrobial Potentials of three *Ganoderma* species. Afr. J. Biomed. Res. 13: 133-139.

Kim, M.Y., P. Seguin, J.K. Ahn., J.J. Kim, S.C. Chun, E.H. Kim, S.H. Seo, E.Y. Kang, S.L. Kim, Y.J. Park., H.M. Ro, and I.M. Chung. 2008. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. Agric. food chem. 56: 7265-7270.

Kopjar, M., V. Pilizota, D. Subaric, and J. Babic. 2009. Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. Croat. J. Food Sci. Technol. 1: 24-30.

Mondal, T., R. Some, and S. Dutta. 2013. Studies on antioxidant and antimicrobial properties of some common mushrooms. JTBSRR. 2: 60-67.

Nehra, K., Meenakshi, M. Kumar, and A. Yadav. 2012. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). IJMRT. 1: 391-400.

Nunboon, J., P. Chotpraderm, K. Ruengruan, and P. Chomnawang. 2010. Effect of medicinal plant extracts and edible mushroom extracts in controlling leaf spot disease (*Alternaria brassicicola*) of cabbage seedling. P. 160-169. In: the 8th International Symposiium on Biocontrol and Biotechnology. P.4-6 October, Pattaya, Thailand.

Nwachukwu, E., and H.O. Uzoeto. 2010. Antimicrobial activity of some local mushrooms on pathogenic isolates. J. Med. Plant Res. 4: 2460-2465.

Pennerman, K.K., Y. Guohua, and W.B. Joan. 2015. Health Effects of Small Volatile Compounds from East Asian Medicinal Mushrooms. Mycobiology. 43: 9-13.

Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur, and H. Kaur. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. IPS. 1: 98-106.

Turkoglu, A., P. Guler, A. Araz, F. Kutluer, and I. Kunduz. 2011. Antifungal Effects of *Clitocybe odora* (Bull.:Fr.) Kumm. Against The Plant Pathogen *Fusarium culmorum* and *Fusarium moniliforme.* Hacettepe. J. Biol. Chem. 39: 57-60.

Vaquero, M.J.R., M.R. Alberto, and M.C. Manca de Nadra. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control. 18: 93-101.

Volf, I., I. Ignat, M. Neamtu, and V.I. Popa. 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. Chem Pap. 68: 121-129.