การกระตุ้นการสะสมสารเออโกไธโอนีอีนในเห็ดขอน (*Lentinus* spp.) และเห็ดน้ำหมึก (*Coprinus comatus*) โดยใช้วัสดุเพาะผสมฮิสทิดีน

Enhancement of L-Ergothioneine in Khon (*Lentinus* spp.) and Inkcap (*Coprinus comatus*) Mushrooms by fortifying substrate with L-histidine

วันดี หวังคะพันธ์[1,2] คมศร ลมไธสง[3] และ นิวัฒ เสนาะเมือง [1*]

Wandee Vangkapun[1], Khomsorn Lomthaisong[2] and Niwat Sanoamuang[1*]

บทคัดย่อ: การทดสอบการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างดอกของเห็ดขอนและเห็ดน้ำหมึกในอาหารที่มีส่วนผสมของฮีสทิดีน เพื่อกระตุ้นการสะสมสารเออโกไธโอนีอีน (L-ergothioneine) พบว่าการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใยผิดปกติเมื่อความเข้มข้นของฮีสทิดีนสูงขึ้นและมีผลต่อการสร้างดอกในเห็ดบางชนิด ฮีสทิดีนความเข้มข้น 500 mg/L ทำให้เส้นใยของเห็ดขอน *Lentinus conatus* และ *Lentinus villosus* บางลง และพบว่าระดับการสะสมสารเออโกไธโอนีอีนขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด การใส่ฮีสทิดีนความเข้มข้น ≤100 mg/L กระตุ้นให้เห็ดน้ำหมึก (*Coprinus comatus*) สะสมสารเออโกไธโอนีอีนสูงขึ้นแต่ไม่มีผลในเห็ดขอน (*Lentinus polychrous* และ *Lentinus squarrosulus*) เมื่อนำผลการศึกษาที่ได้มาพิจารณาสามารถแนะนำได้ว่าการผสมฮีสทิดีนลงในอาหารเลี้ยงเห็ดสามารถกระตุ้นการสร้างสารเออโกไธโอนีอีนซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระในเห็ดน้ำหมึก แต่ต้องมีการศึกษามากขึ้นหากต้องการนำไปใช้กับเห็ดขอน
คำสำคัญ: เห็ดขอน, เห็ดน้ำหมึก, ฮีสทิดีน, เออโกไธโอนีอีน

ABSTRACT: Growth characteristics and fruiting on histidine (His) amended PDA and levels of L-ergothioneine (ERG) in fruiting bodies of various mushroom species were determined. It was found that growth and mycelial density of some mushroom species were interfered with the higher concentrations of His and the ability to produce fruiting bodies of some species was impaired. The addition of 500 mg/L in PDA produced slender mycelial density of khon mushrooms species such as *Lentinus conatus* and *Lentinus villosus*. The levels of ERG accumulated in fruiting bodies depended on mushroom species. The addition of ≤100 mg/L stimulated inkcap mushroom (*Coprinus comatus*) to accumulate ERG but did not in khon mushrooms (*Lentinus polychrous* and *Lentinus squarrosulus*). Taking these results into consideration, suggested that the addition of His into substrate is an effective mean to enhance the accumulation of antioxidant properties in inkcap mushroom but needs more study on khon mushrooms.
Keywords: *Coprinus comatus*, *Lentinus* spp., histidine, L-ergothioneine

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Plant Sciences and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University, 40002

[3] ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University

* Corresponding author: niwat@kku.ac.th

แก่นเกษตร 39 : 221-230 (2554).

บทนำ

เห็ดเป็นทั้งอาหารและยารักษาโรคที่สำคัญของโลกและชาวไทยมานานนับพันปีแล้ว และเห็ดเป็นที่สนใจเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารของมนุษย์มากขึ้น เนื่องจากในเห็ดมีเยื่อใยมาก โปรตีนสูง ไขมันต่ำ เหมาะที่จะนำมาประกอบอาหารเพื่อสุขภาพ ในเห็ดยังมีสารที่พร้อมจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่มีประโยชน์เช่น สารเออโกสเตอรอล (ergosterol) เมื่อถูกแสงแดด แสงอัลตราไวโอเลตก็จะเปลี่ยนให้เป็นสารเออโกแคลซิฟีรอล (ergocalciferol) หรือที่เป็นที่รู้จักกันดีเรียกทั่วไปว่าวิตามินดี นอกจากนี้เห็ดยังสามารถเจริญเติบโตและใช้สารอาหารที่มีโมเลกุลซับซ้อนได้ดี มีความสามารถเปลี่ยนสารอนินทรีย์เป็นสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมากเช่นสามารถเปลี่ยนสารโซเดียมเซเลไนต์ (sodium selenite) ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายสูงให้เป็นสารเซเลโนโปรตีน (selenoproteins) หรือเซเลเนียม (selenium) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระและมีคุณสมบัติต่อต้านการกลายพันธุ์ของไวรัสหลายชนิด (Rodriguez Estrada et al., 2009) และในเห็ดมีสารสำคัญ เช่น น้ำตาลเชิงซ้อนโมเลกุลใหญ่ที่ต่อกันด้วยสายโซ่เบตากลูแคน มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Chihara et al., 1970; Tabata et al., 1981) ต่อต้านสารก่อมะเร็ง (Lee and Nishizawa, 2003; Pinheiro et al., 2003) และสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (Fu and Shieh, 2002; Cheung et al., 2003; Yang et al., 2002)

เออโกไธโอนิอีนเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นมาในสภาพกดดันระหว่างการเจริญของเห็ดและมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระได้ดี เออโกไธโอนีอีนเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอล ชื่อเคมีคือ 2-mercaptohistidine trimethylbetaine เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาตามธรรมชาติโดยความสามารถของแบคทีเรียและเห็ดราบางชนิด (Genghof, 1970) แต่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์สารนี้ขึ้นเองได้ มนุษย์ได้รับสารนี้มาจากการบริโภคเห็ดและเนื้อสัตว์ (Jang et al., 2004) ในร่างกายของมนุษย์พบสารเออโกไธโอนีอีนได้ในสมอง เม็ดเลือดแดง ตับ ไต พลาสมาและของเหลวภายในตา (Kaneko et al., 1980; Mitsuyama and May, 1999) ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสารนี้ทำหน้าที่ใดที่สำคัญต่อร่างกาย เพียงแต่พบว่าสารนี้มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระและต้านสารก่อมะเร็งเท่านั้น (Asmus et al., 1996; Hartman and Hartman, 1987) การมีสารนี้ในร่างกายและพบได้ในเห็ดเป็นที่สนใจศึกษามากขึ้นเนื่องจากมีวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวัดปริมาณของสารนี้ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น (Dubost et al., 2006) และพบเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในร่างกายของมนุษย์

สารเออโกไธโอนีอีนพบเป็นครั้งแรกในเม็ดสเคลอโรเตียมของราเออกอต (*Claviceps purpurea*) เมื่อปี ค.ศ. 1909 ส่วนในเห็ดพบเป็นครั้งแรกในเห็ดน้ำหมึก (*Coprinus comatus*) เมื่อกว่า 50 ปีมาแล้ว (List 1957, Badalyan et al., 2003) แต่หลังจากนั้นพบได้ในเห็ดอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *Agaricus bisporus*, *Boletus* spp., *Cantharellus cibarius*, *Claviceps* spp., *Grifola frondosa*, *Lyophyllum connatum*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* (Dubost et al., 2007a; Dubost et al., 2007b; Ey et al., 2007; Kimura et al., 2005) จากการศึกษาเกี่ยวกับเมตาโบลิซึมของการสังเคราะห์สารเออโกไธโอนีอีนพบว่ามีกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ คือ cysteine, histidine และ methioneine (Askart and Melville. 1962) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เห็ดสร้างสารเออโกไธโอนีอีนให้มากขึ้นจากการเติมกรดอะมิโนเหล่านี้ลงในวัสดุเพาะ เช่นการใช้สารฮิสทิดีนกระตุ้นเห็ด *A. bisporus* (Dubost et al., 2007c) *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* (Rodriguez Estrada et al., 2009) และใช้ methioneine กระตุ้นในเห็ด *Ganoderma neo-japonicum* (Lee et al., 2009)

เนื่องจากประเทศไทยมีการบริโภคเห็ดค่อนข้างมาก มีเห็ดหลายชนิดที่นำมาใช้บริโภคสดในรูปของผักหรือบางชนิดเริ่มพัฒนาไปเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ เห็ดขอน *Lentinus* spp. เป็นเห็ดที่มีผู้นิยมรับประทานเพราะมีรสชาติอร่อยและจัดเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย ทั้งยังมีคุณค่าทางอาหารและมีการนำไปใช้เป็นยา (Jianzhe et al., 1987;

นิวัฒ 2553) รวมทั้งเห็ดน้ำหมึก (*Coprinus comatus*) วัตถุประสงค์นี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณสาร L-ergothioneine ในเห็ดขอนและเห็ดน้ำหมึกด้วยการเติมสารฮิสทิดีนลงในอาหาร อาจช่วยสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเห็ดได้

วิธีการศึกษา

การเจริญบนอาหารที่ผสมฮิสทิดีน

การเตรียมเชื้อเห็ดสกุล *Lentinus* spp.

เห็ดที่ใช้ในการทดลองเป็นเห็ดขอนสกุล *Lentinus* spp. ทั้งหมด 7 ไอโซเลต (*Lentinus connatus, L. polychrous* (NW03), *L. polychrous* (KKU), *L. similis, L. squarrosulus, L. villosus* (NW04) และ *L. villous* (NW05)) และเห็ดน้ำหมึก *Coprinus comatus* เตรียมเชื้อโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 6 วัน ตัดเส้นใยพร้อมวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เพื่อนำไปใช้ปลูกเชื้อในอาหารทดลองต่อไป

การทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA ที่ผสมฮิสทิดีน

ทำการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA ที่ผสมฮิสทิดีนที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 mg/L) โดยย้ายเส้นใยเห็ดจากอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ตามที่กล่าวข้างต้น มาวางตรงกลางในจานอาหารที่ผสมฮีสติดีนแต่ละความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7 วัน ทำอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ดทุก 24 ชม. จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยสายตา โดยให้ค่าคะแนนด้วยเครื่องหมาย + (++++ หมายถึง เส้นใยเจริญได้ปกติไม่แตกต่างจากชุดควบคุม, +++ หมายถึง เส้นใยเจริญได้น้อยลงแต่ลักษณะเส้นใยยังปกติ, ++ หมายถึง ทั้งความหนาแน่นของเส้นใยลดลง ขนาดโคโลนีได้รับผลกระทบเล็กน้อย และ, + หมายถึง เส้นใยบางมากและขนาดของโคโลนีมีขนาดเล็กลง) คัดเลือกเห็ดไอโซเลตที่เจริญได้ดีที่สุด เป็นที่นิยมบริโภคไปทำการทดลอง

การสร้างดอกของเห็ดบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีน

การเตรียมหัวเชื้อ (spawn)

เลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวฟ่างที่เตรียมโดยนึ่งข้าวฟ่างให้สุก นำไปผึ่งลมให้หมาด แล้วบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างลงในขวดปริมาณ 50 กรัม อุดปากขวดด้วยสำลีนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเขี่ยเส้นใยเชื้อเห็ดที่ต้องการจากอาหาร PDA ลงไปขวดละ 1 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ จนเชื้อเจริญเต็มข้าวฟ่าง

การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดขอน

เพาะเห็ดในวัสดุเพาะขี้เลื่อยสูตรดังนี้ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 78% น้ำตาล 15% รำละเอียด16% ปูนขาว 1% ยิมซั่ม 2% ดีเกลือ 0.5% โดยเตรียมทั้งหมด 3 กรรมวิธี คือ วัสดุเพาะขี้เลื่อย, ขี้เลื่อยผสมกับฮิสทิดีน 100 มก./กก. และขี้เลื่อยผสมกับฮิสทิดีน 1,000 มก./กก. ปรับความชื้นให้ได้ 65 % บรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 18.5 x 30.5 ซม. ในปริมาณถุงละ 500 กรัม อัดวัสดุให้แน่นใส่คอพลาสติกและอุดด้วยจุกสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์/ตร.นิ้วอุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นแล้วเขี่ยหัวเชื้อข้าวฟ่างใส่ถุงเพาะ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (29-32°ซ) จนเชื้อเจริญเต็มถุง จากนั้นปล่อยให้เส้นใยแก่อีกประมาณ 20 วัน จึงนำไปเปิดถุงให้ออกดอกโดยดึงจุกสำลีและคอพลาสติกออก รัดปากถุงด้วยยางให้แน่น ใช้ใบมีดกรีดถุงเป็นรอย 4 รอย รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น การเก็บดอกเห็ด บันทึกขนาดดอก และชั่งน้ำหนักจากนั้นล้างทำความสะอาด วางผึ่งในตะกร้าให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บรรจุใส่ถุงพลาสติกแช่เก็บไว้ในตู้ -20 °ซ รอการวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดน้ำหมึก

เตรียมฟางหมักเป็นวัสดุเพาะ โดยมีส่วนผสมตามสัดส่วนดังนี้ ฟางข้าวสับขนาดยาวประมาณ 2.5 ซม. 15 กก. รำละเอียด 750 กรัม ยิปซัม 300 กรัม ยูเรีย 150 กรัม ปูนขาว 150 กรัม ขั้นตอนการทำฟางหมักเริ่มจากแช่ฟางข้าวให้เปียกน้ำประมาณ

1 ซม. ยกออกให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นโรยยูเรียให้ทั่วคลุกเคล้าให้เข้ากัน ย่ำฟางให้แน่น คลุมด้วยพลาสติกให้มิดชิด หมักทิ้งไว้ 2 คืน เปิดพลาสติกกลับกองฟางเพื่อระบายความร้อน โรยปูนขาวให้ทั่วคลุกให้เข้ากัน ย่ำฟางให้แน่น หมักต่ออีก 2 คืน เปิดพลาสติกเพื่อกลับฟางอีกครั้งแล้วโรยยิปซัม หมักอีกหนึ่งคืนโดยไม่ต้องคลุมพลาสติก จากนั้นโรยรำละเอียดให้ทั่วฟาง คลุกเคล้าให้เข้ากัน คลุกให้ฟางเปียกอย่างทั่วถึงแต่ไม่แฉะ แล้วบรรจุฟางหมักลงถุงพลาสติก มัดปากถุง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยไว้ให้เย็น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากกรรมวิธีที่ผสมกับฮิสทิดีน 5 กรรมวิธี ผสมกับฟางหมักโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก ดังนี้ วัสดุเพาะฟางหมัก, ฟางหมัก ผสมฮิสทิดีน 100 มก./กก., ฟางหมัก ผสมฮิสทิดีน 500 มก./กก., ฟางหมัก ผสมฮิสทิดีน 1,000 มก./กก. และฟางหมัก ผสมฮิสทิดีน 5,000 มก./กก.

เพาะเห็ดน้ำหมึก *C. comatus* ในตะกร้าพลาสติกขนาด 20 x 28 x 10 ซม. นำมาทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วย 70%แอลกอฮอล์ นำวัสดุเพาะฟางหมักที่ฆ่าเชื้อแล้วปูรองก้นตะกร้า โรยหัวเชื้อเห็ดแล้วปูทับด้วยวัสดุเพาะฟางหมัก โดยทำทั้งหมด 3 ชั้น ใช้หัวเชื้อ 50 กรัม วัสดุเพาะ 800 กรัม ต่อหนึ่งตะกร้า จากนั้นครอบตะกร้าด้วยถุงพลาสติก แล้วมัดปากถุง บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มตะกร้า เมื่อเส้นใยเห็ดเริ่มรวมตัวเป็นตุ่มสีขาว คลายปากถุงเพื่อระบายอากาศ

การเก็บดอกเห็ดเก็บในช่วงเวลา 16.00-18.00 น. โดยเก็บดอกที่ยังตูมอยู่ บันทึกขนาดดอก และชั่งน้ำหนัก จากนั้นล้างทำความสะอาด วางผึ่งในตะกร้าให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ บรรจุใส่ถุงพลาสติกแช่เก็บไว้ในตู้ -20 °ซ เพื่อรอการวิเคราะห์

คำนวณค่าประสิทธิภาพในการใช้อาหาร

ชั่งน้ำหนักเห็ดสดที่เก็บได้แล้วนำไปคำนวณตามสมการคณิตศาสตร์โดย ค่าประสิทธิภาพในการใช้อาหาร (B.E., biological efficiency) คำนวณจากสูตรดังนี้ %B.E. = (ผลผลิตเห็ด/น้ำหนักวัสดุเพาะ) x 100

การวิเคราะห์ปริมาณสาร L- ergothioneine ในเห็ดขอน

การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์หาปริมาณสารเออโกไธโอนีอีน ดำเนินการตามวิธีการของ Dubost et al. (2007b) โดยนำเห็ดที่แช่แข็งไปทำให้แข็งแห้งโดยเทคนิคแข็งแห้ง (lyophilization) แล้วบดให้เป็นผง ใส่ภาชนะมิดชิดหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยด์นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ รอเวลาการสกัด

ขั้นตอนการสกัดใช้ผงเห็ด 1 กรัม เติมสารละลาย (70% ethanol, 10mM dithiothreitol, 100 µM betaine) ปริมาตร 20 มล. และ 1.0% ethanolic sodium dodecylsulfate ปริมาตร 4 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส 1 มล. นำไปทำให้แห้งด้วย nitrogen gas จากนั้นละลายกลับด้วยน้ำ deionize 0.5 มล. แล้วกรองด้วย syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ รอการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์หาสาร L- ergothioneine ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์หาสารเออโกไธโอนีอีนด้วยเครื่อง HPLC ด้วย C18 column ขนาด 250×4.6 มม. โดยใช้ mobile phase แบบ isocratic (50 mM sodium phosphate 3% acetonitrile and 1% triethylamine (pH 7.3)) ใช้สารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ที่อัตราการไหล 1 มล./นาที แล้วตรวจวัดด้วย UV-VIS ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารเออโกไธโอนีอีน จากตัวอย่างเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารเออโกไธโอนีอีนเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารเออโกไธโอนีอีนในสารละลายตัวอย่างเห็ดแห้ง 1 กรัม

ผลการศึกษา

การเจริญของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA ผสมฮิสทิดีน

จากการเลี้ยงเห็ดขอนและเห็ดน้ำหมึกบนอาหาร PDA ผสมฮิสทิดีนที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50,

100, 500, 1000 มก./ลิตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ ตามเวลาต่างๆ กัน พบว่าเมื่อให้เห็ดแต่ละชนิดเจริญเป็นเวลา 120 ชม. ความกว้างเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางมีค่า 70.37 ± 5.8 มม. เห็ดเกือบทุกชนิดตอบสนองต่อสารฮิสทิดีนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (10 และ 50 มก./ลิตร) โดยเจริญได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของสารฮิสทิดีนเพิ่มมากขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 500 มก./ลิตรการเจริญของเส้นใยเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่ผสมสารฮิสทิดีน สอดคล้องกับลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยบางลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อระดับความเข้มข้นมากขึ้น เห็ดขอน (*L. connatus* และ *L. villosus*) มีความไวมากที่สุด และหยุดการเจริญเติบโตเมื่อความเข้มข้นของสารฮิสทิดีนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เห็ดบด (*L. polychrous*) และเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) ทนทานต่อสารฮิสทิดีนจนถึงระดับความเข้มข้น 100 มก./ลิตรส่วนลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยเริ่มบางลงตั้งแต่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารฮิสทิดีน ความเข้มข้น 100 มก./ลิตรและเห็นได้ชัดเจนมีสีขาวฟู โดยเส้นใยเห็ดขอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตามลักษณะของเชื้อแต่ละชนิด ในอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของฮิสทิดีน สูงเส้นใยเห็ดทุกชนิดจะมีการเจริญได้ช้ากว่าอาหารที่ผสมฮิสทิดีนในปริมาณต่ำ โดยที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 มก./ลิตรพบว่ามีการตายของเส้นใยในเห็ด *L. connatus* (**Figure 1**) โดยจากการทดสอบนี้เชื้อเห็ดที่เจริญบนอาหารที่ผสมฮิสทิดีนได้ดีคือเห็ดลม (*L. polychrous*) เห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) และเห็ดน้ำหมึก (*C. comatus*) (**Table 1**) โดยความหนาแน่นของเส้นใยของเห็ดทั้ง 3 ชนิด หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชม. เส้นใยมีความหนาแน่นสม่ำเสมอกัน

การออกดอกของเห็ดบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีน

การออกดอกของเห็ดขอน

ความสามารถออกดอกบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีนของเห็ดขอน *L. polychrous* (NW03), *L. polychrous* (KKU) และ *L. squarrosulus* ในช่วง วันที่ 1 มกราคม 2552 ถึง 15 เมษายน 2552 ที่ความเข้มข้น คือ 0, 100 และ 1000 มก./ลิตร พบว่าเส้นใยเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) สามารถเจริญบนวัสดุเพาะผสมฮิสทิดีน 100 มก./ลิตร ใช้เวลา 19-20 วัน ซึ่งเจริญได้เร็วกว่าเห็ดลม (*L. polychrous*) ทั้ง 2 ไอโซเลต ซึ่งใช้เวลาในการเจริญบนวัสดุเพาะ 20-22 วัน ส่วนการเจริญบนวัสดุเพาะผสมฮิสทิดีน 1,000 มก./ลิตรของเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) กับการเจริญบนวัสดุเพาะผสมฮิสทิดีน 100 มก./ลิตรของเห็ดลม (*L. polychrous*) ไม่ต่างกันใช้ระยะเวลาประมาณ 23 วัน

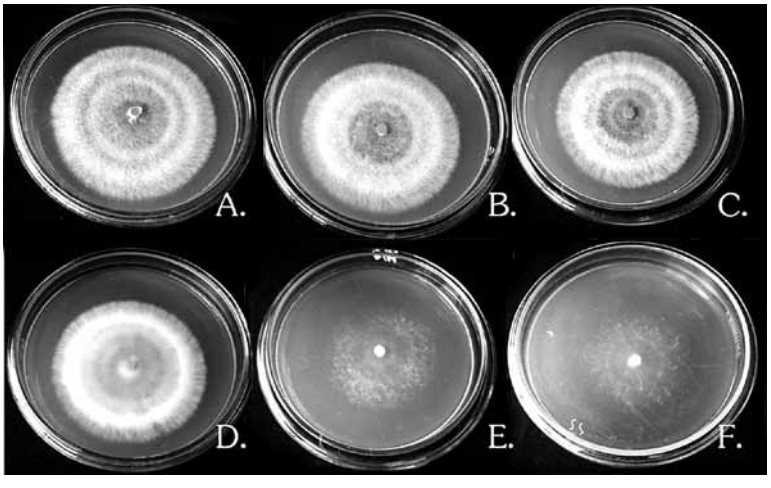

Figure 1 Density of mycelium of *Lentinus connatus* on PDA amended with histidine at various concentrations. A: 0, B: 10, C: 50, D: 100, E: 500 and F: 1,000 mg/L.

Table 1 Effect of L-histidine at various concentrations on colony growth and mycelium density of *Lentinus* spp. and *Coprinus comatus*.

Isolates	Colony diameter (dia. mm.) at 120 hrs. and density of mycelium (myc. ++..)												Mean[3/]
	0 mg/L		10 mg/L		50 mg/L		100 mg/L		500 mg/L		1,000 mg/L		
	Dia.	Myc.	Dia.	Myc.	Dia.	Myc.	Dia.	Myc.	Dia.	Myc.	Dia.	Myc.	
Lentinus connatus	76.5[1/]	++++	74.4	++++	77.2	++++	69.8	+++	55.7	+	50.7	+	67.4 ±11.4c
Lentinus polychrous	76.0	++++	79.7	++++	79.3	++++	79.3	++++	75.3	++++	70.3	++++	76.6 ±3.6a
Lentinus polychrous (KKU)	80.7	++++	81.9	++++	80.6	++++	75.5	++++	73.6	++++	52.0	++++	74.1 ±11.3ab
Lentinus similis	58.3	++++	63.6	++++	62.0	++++	60.3	++++	57.7	+++	52.0	++	59.0 ±4.1d
Lentinus squarrosulus	84.0	++++	76.0	++++	78.3	++++	75.5	++++	68.7	++++	64.7	++++	74.5 ±6.9ab
Lentinus villosus	71.7	++++	71.1	++++	68.8	++++	65.6	++++	63.0	+++	58.4	+++	66.4 ±5.1cd
Lentinus villosus (NW05)	67.7	++++	73.7	++++	74.0	++++	74.0	++++	71.0	+++	67.7	+++	71.3 ±3.0bc
Coprinus comatus	68.1	++++	76.2	++++	74.2	++++	77.5	++++	74.8	++++	69.8	++++	73.4 ±3.7b
Mean[2/]	72.9±8.2b		74.6 ±5.6a		74.3 ±6.2a		72.2 ±6.5b		67.5 ±7.8c		60.7 ±8.4d		70.4 ±5.8

LSD at P = 0.05 = 3.92 , CV = 3.44%

[1/] Mean colony diameter of individual species on a single concentration of histidine

[2/] Mean colony diameter of all species on a single concentration of histidine and means within row followed by the same letter are not significantly at P< 0.05 according to DMRT.

[3/] Mean colony diameter of individual species on various concentrations of histidine and means within coloum followed by the same letter are not significantly at P< 0.05 according to DMRT.

ผลผลิตดอกเห็ดที่ได้มีปริมาณน้อย และที่ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร เห็ดขอนทุกไอโซเลตไม่สามารถออกดอกได้ โดยที่ไอโซเลต *L. polycrous* (KKU) สามารถออกดอกเฉพาะวัสดุเพาะที่ไม่ผสมฮิสทิดีนเท่านั้นจึงทำการเพาะเห็ดลม (เฉพาะไอโซเลต *L. polychrous* (NW03)) และเห็ดขอนขาวใหม่อีกครั้งในช่วงวันที่ 15 มีนาคม 2552 ถึง 15 กรกฎาคม 2552 บนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีนที่ความเข้มข้น 0, 10 และ 100 มก./ลิตร น้ำหนักวัสดุเพาะ 500 กรัม/ถุง พบว่าเห็ดลม และเห็ดขอนขาว สามารถออกดอกได้จากทุกกรรมวิธี โดยบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีน 0 และ 10 มก./ลิตร เชื้อเห็ดขอนขาว ให้ปริมาณผลผลิตรวมมากกว่าเห็ดลมมีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการให้ผลผลิตสูงกว่า และความเข้มข้นฮิสทิดีน 100 มก./ลิตร ปริมาณผลผลิตรวมและประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน (**Table 2**)

การออกดอกของเห็ดน้ำหมึก

การศึกษาอยู่ในช่วงแรก วันที่ 4 ธันวาคม 2551 ถึง 10 มกราคม 2552 โดยทำทั้งหมด 3 กรรมวิธี ใช้ปริมาณสาร L-hitidine ที่ 0, 50 และ 500 มก./กก. อุณหภูมิอยู่ในช่วง 27-29˚ซ โดยพบว่าเส้นใยเห็ด *C. comatus* สามารถเจริญเต็มวัสดุเพาะ ใช้เวลา 6-10 วัน จากนั้นใช้เวลา 5-6 วัน ในการรวมตัวของเส้นใยพัฒนาเป็นตุ่มเล็กๆ สีขาว และเก็บดอกเห็ดได้ในอีก 3-5 วัน จากนั้นดอกเห็ดเริ่มบาน แล้วหมวกดอกจะเริ่มย่อยสลายตังเอง มีลักษณะคล้ายน้ำหมึกสีดำ ซึ่งจะเกิดภาย 24 ชม.

การศึกษาในช่วงที่ 2 อยู่ระหว่าง เดือนมีนาคม 2552 ถึง เดือนเมษายน 2552 ในครั้งนี้ทำการทดลอง 5 กรรมวิธี คือใช้ปริมาณสาร L-hitidine ที่ 0, 100, 500, 1,000 และ 5,000 มก. เห็ดน้ำหมึกสามารถออกดอกได้ในทุกกรรมวิธี

Table 2 Effect of L-histidine at different concentrations on production of basidiomata, yield, biological efficiency (BE) and accumulation of L-ergothioneine (Mean ± SD) in mushrooms.

Isolates/conc. of histidine	No. of basidiomata	Yield (g)	BE (%)	L-ergothioneine (mg/g DW)
Lentinus polychrous				
0 mg/Kg	12.0 ± 2.5b	35.3 ± 10.1ab	7.1 ± 2.0a	1.23 ± 0.02bc
10 mg/Kg	13.0 ± 4.2ab	22.2 ± 2.7b	4.4 ± 0.5ab	0.92 ± 0.01c
100 mg/Kg	13.0 ± 2.5b	24.4 ± 5.6b	4.9 ± 1.1b	1.49 ± 0.03b
Lentinus squarrosulus				
0 mg/Kg	19.0 ± 3.6a	42.6 ± 13.6a	8.5 ± 2.7ab	2.22 ± 0.01a
10 mg/Kg	17.0 ± 4.4ab	30.9 ± 8.3ab	6.2 ± 1.7b	1.59 ± 0.07b
100 mg/Kg	17.0 ± 2.1ab	24.8 ± 7.4b	4.9 ± 1.5b	2.59 ± 0.04a
LSD (P=0.05)	8.72	15.98	3.20	0.79
CV %	39.06	26.56	26.60	26.62
Coprinus comatus				
0 mg/Kg	80.7 ± 14.9ab	144.9 ± 27.3ab	18.1 ±3.41a	2.17 ± 0.01c
100 mg/Kg	91.0 ± 10.1a	87.7 ± 11.4c	10.9 ±1.43b	5.04 ± 0.03a
500 mg/Kg	59.3 ± 3.1c	112.8 ± 0.9bc	16.1 ±3.35ab	3.40 ± 0.02b
1,000 mg/Kg	65.7 ± 14.5bc	126.8 ± 34.5b	15.8 ±4.31ab	3.50 ± 0.02b
5,000 mg/Kg	80.0 ± 9.8ab	166.1 ± 13..3a	20.7 ±1.66a	3.43 ± 0.02b
LSD (P=0.05)	20.63	38.53	11.95	1.42
CV %	14.98	16.60	37.86	22.33

Means within column and within genera, *Lentinus spp.* and *Coprinus comatus*, followed by the same letter are not significantly different at P< 0.05 according to DMRT

ปริมาณการสะสมสาร L- ergothioneine ในดอกเห็ด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเออโกไธโอนีอีนของเห็ดทั้ง 3 ชนิด คือ *L. polychrous* (NW03), *L. squarrosulus* และ *C. comatus* ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าในเห็ด *L. polychrous* (NW03) ปริมาตร 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ที่ได้จากการเลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีน 0, 10, 100 มก./ลิตร มีปริมาณสารเออโกไธโอนีอีนเท่ากับ 1.23 ± 0.02, 0.92 ± 0.01 และ 1.49 ± 0.03 มก. ตามลำดับ ส่วนเห็ด *L. squarrosulus* ที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีน 0, 10, 100 มก./ลิตร มีปริมาณสารเออโกไธโอนีอีน 2.22 ± 0.01, 1.59 ± 0.07 และ 2.59 ± 0.04 มก. ตามลำดับ (Table 2) ส่วนปริมาณสารเออโกไธโอนีอีนของเห็ดน้ำหมึก (*C. comatus*) ที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะที่ผสมฮีสทิดีนที่ความเข้มข้น 0, 100, 500, 1,000 และ 5,000 มก./ลิตร แสดงใน Table 2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยมีค่าเฉลี่ยของสารเออโกไธโอนีอีนเท่ากับ 2.17 ± 0.01, 5.04 ± 0.03, 3.4 ± 0.02, 3.5 ± 0.02 และ 3.43 ± 0.02 มก./กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การตอบสนองต่อสารฮิสทิดีนอยู่ในช่วงความเข้มข้น 100 มก./ลิตร

วิจารณ์

เออโกไธโอนิอีนเป็นสารที่ส่วนสำคัญในกลไกทางสรีรวิทยาในร่างกายมากมาย เช่นการปกป้องไซโตพลาสซึม ให้พลังงานและกระตุ้นเมตาโบลิซึมในร่างกาย ลดความดันตาและปกป้องดวงตามิให้เกิดต้อกระจก และต่อต้านการอักเสบ บวมแดงและความเสียหายของเซลล์เนื้อเยื่อปอดและตับเป็นต้น (Shukla et al., 1981, Kawano et al., 1982, Paul and Snyder, 2009) เออโกไธโอนิอีนจากเห็ดยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการรักษาสีเนื้อของปลาให้สดใส มีสีแดงของเนื้อปลาในอุตสาหกรรมต่อเนื่องจากปลาสดได้เป็นอย่างดี (Bao et al., 2010) กระบวนการสร้างเสริมหรือกระตุ้นให้เห็ดสะสมสารเออโกไธโอนิอีนให้มีความเข้มข้นมากขึ้นน่าจะเป็นทางเลือกที่คุ้มต่อการลงทุน

Imtiaj et al. (2009) ทำการทดลองเปรียบเทียบสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดกินได้ 6 ชนิดคือ เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) เห็ดโคนญี่ปุ่น (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเข็มทอง (*Flammolina velutipes*) เห็ดขอน (*Lentinus lepideus*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) และเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) แล้วพบว่ากรดอะมิโนฮิสทิดีนที่นำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตของเห็ดทดลอง มีผลไปยับยั้งการใช้ไนโตรเจนของเห็ด ทำให้เส้นใยผอมบางผิดปกติ นอกจากฮิสทิดีนแล้ว กรดอะมิโน เมไธโอนีน (methionine) มีผลกระทบต่อการเจริญของเส้นใยเช่นเดียวกัน ผลกระทบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับทั้งปริมาณความเข้มข้นของและชนิดของเห็ดแต่ละชนิด

ในการศึกษาครั้งนี้ ฮิสทิดีนมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดขอนและเห็ดน้ำหมึก กรดอะมิโนฮิสทิดีนที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 มก./ลิตร ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและความกว้างของโคโลนี และส่งผลไปถึงความสามารถให้ดอกของเห็ดและประสิทธิภาพในการใช้สารอาหาร (% BE) การผสมฮิสทิดีนหรือเมไธโอนีนแต่เพียงสารเดียวอาจไม่คุ้มค่าต่อการกระตุ้นให้เห็ดสะสมสารเออโกไธโอนิอีน เท่าที่มีข้อมูลน่าจะมีการใช้กรดอะมิโนหลายชนิดมากระตุ้นเช่น ใช้กรดอะมิโนฮิสทิดีน เมไธโอนีนและซิสติอีน (cysteine) ซึ่งเป็นสารสำคัญในกลไกการสร้างเออโกไธโอนิอีน และใช้ไกลซีน (glycine) แอมโมเนียม อะซิเตต (ammonium acetate) และแคลเซียมไนเตรต (calcium nitrate) ผสมในอาหารด้วยเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใย (Imtiaj et al. 2009) เมื่อเส้นใยเห็ดแข็งแรง การให้ดอก ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการสะสมเออโกไธโอนิอีนอาจมีมากขึ้น

การกระตุ้นให้เห็ดสร้างวิตามินดีและสารเซเลเนียมในดอกค่อนข้างแปรผันตามความเข้มข้นและเวลาในการกระตุ้น เห็ดสะสมวิตามินดีได้มากหากกระตุ้นด้วยความเข้มข้นของแสงอัลตราไวโอเลต ชนิดบี สูงเป็นเวลานานขึ้น (Rodriguez Estrada and Royse, 2011) ในทำนองเดียวกันเห็ดสะสมเซเลเนียมในดอกมากขึ้น

เมื่อเพิ่มปริมาณโซเดียม เซเลไนต์ ในวัสดุเพาะมากขึ้น (Rodriguez Estrada et al, 2009, Rodriguez Estrada and Royse, 2011)) แต่ในกรณีของการสะสมสารเออโกไธโอนิอีนไม่เป็นเช่นนั้น Dubost et al. (2007) ได้ประเมินความเข้มข้นของสารเออโกไธโอนิอีนในเห็ดแชมปิญองที่ตอบสนองต่อวัสดุเพาะที่มีสารเสริมฮิสทิดีนแล้วพบว่าในเห็ดที่ออกดอกชุดแรกจะมีปริมาณสารเออโกไธโอนิอีนน้อยกว่าเห็ดที่ออกดอกในชุดที่ 2 และ 3 และปริมาณความชื้นในอาหารมีผลต่อปริมาณสารที่สะสมในดอกเห็ดเช่นเดียวกัน

เห็ดบด (*L. polychrous*) และเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus*) ไม่ตอบสนองต่อฮิสทิดีนที่ผสมในวัสดุ ไม่ว่าจะผสมฮิสทิดีนมากขึ้นหลายเท่า แต่ปริมาณสารเออโกไธโอนิอีนที่พบมีปริมาณใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และมีค่าใกล้เคียงกับที่ Lee et al (2009) ได้วิเคราะห์ได้ แต่ในเห็ดน้ำหมึก (*C. comatus*) ตอบสนองต่อวัสดุเพาะที่ผสมฮิสทิดีนอย่างมีนัยสำคัญในช่วงความเข้มข้นของสารไม่เกิน 100 มก./กก. และปริมาณสารเออโกไธโอนิอีนที่พบใกล้เคียงกับที่พบในธรรมชาติเช่นเดียวกับในเห็ดขอน ในธรรมชาติสารเออโกไธโอนิอีนที่พบในเห็ดน้ำหมึกมีปริมาณความเข้มข้นของสารในดอกมากกว่าในเห็ดชนิดอื่นๆ ประมาณ 5 เท่าของที่พบในเห็ดชนิดอื่นๆ

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการสะสมสารเออโกไธโอนิอีนในเห็ดยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยใดบ้าง ทิศทางการตอบสนองมิได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของฮิสทิดีน (Dubost et al, 2007; Rodriguez Estrada et al, 2009) หรือความเข้มข้นของเมไธโอนีน (Lee et al., 2009) และยังไม่ทราบกลไกการสร้าง สะสม สารเออโกไธโอนิอีนในดอกเห็ด การสะสมสารเออโกไธโอนิอีนในดอกเห็ดอาจเกิดขึ้นจากการชักนำให้เกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมจากสภาวะเครียด (Dubost et al., 2007) ปัจจัยที่ชัดเจนเกี่ยวข้องกับปริมาณสารเออโกไธโอนิอีนคือความชื้นที่ระดับประมาณ 50 % ในวัสดุเพาะทำให้มีการสะสมสารเออโกไธโอนิอีนในดอกเห็ดมาก (Rodriguez Estrada and Royse, 2011) แต่ความชื้นระดับนี้มีผลลดปริมาณดอกของเห็ดที่ผลิตได้ เป็นอัตราส่วนที่ผกผันต่อกัน การตัดสินใจจึงต้องเลือกระหว่างผลผลิตกับปริมาณของสารเออโกไธโอนิอีนที่จะได้ว่าจะคุ้มค่าอย่างไร

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

นิวัฒ เสนาะเมือง. 2553. เห็ดเกี่ยวข้องกับมนุษย์และสำคัญกับป่าอย่างไร. แก่นเกษตร 38:187-190.

Askart, A. and D.B. Melville. 1962. The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an Intermediate. The J. Biol. Chem. 237:1615-1618.

Asmus, K.D., R.V. Bensasson, J.L. Bernier, R. Houssin and E.J. Land. 1996. One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C. Biochem. J. 315:625-629.

Badalyan, C.M., A.V. Gasparyan and N.G. Garibyan. 2003. Investigation of antioxidant activity of some basidial macromycetes. Mikol Fitopatol. 37:63-68.

Bao, H.N.D., K. Osako and T. Ohshima. 2010. Value-added use of mushroom ergothioneine as a colour stabilizer in processed fish meats. J. Sci. Food and Agri. 90:1634-1641.

Cheung, L.M., P.C.K., Cheung, and V.E.C. Ooi. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem. 81:249-255.

Chihara, G., J. Hamuro, Y.Y. Maeda, Y. Arai and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (an edible mushroom). Cancer Res. 30:2776-2781.

Dubost, N.J., B. Ou and R.B. Beelman. 2007a. Quantification of polyphenals and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. Food Chem. 105:727-735.

Dubost, N.J., R.B. Beelman and D.G. Peterson. 2007b. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectrometry. Food Science Dept. Pennsylvania state University. USA.

Dubost, N.J., R.B. Beelman and D.J. Royse. 2007c. Influence of selected cultural factors and postharvest storage on ergothioneine content of common button mushroom *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach (Agaricomycetideae). Int. J. Med. Mushrooms 9:163-176.

Dubost, N.J., R.B. Beelman, D. Peterson and D.J. Royse 2006. Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. Int. J. Med. Mushrooms 8:215-222.

Ey, J., E. Schomig and D. Taubert. 2007. Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. J. Agri. Food Chem. 55: 6466-6474.

Fu, H.Y. and D. Shieh. 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. J. Food Lipids 9:35-46.

Genghof, D.S. 1970. Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by fungi and Actinomycetales. J. Bact. 103: 475-478.

Hartman, Z. and P.E. Hartman. 1987. Interception of some directacting mutagens by ergothioneine. Environ. Mol. Mutagen. 10:3-15.

Imtiaj, A., C. Jayasinghe, G.W. Lee and T.S. Lee. 2009. Comparative study of environmental and nutritional factors on the mycelial growth of edible mushrooms. J. Cult. Collections 6: 97-105.

Jang, J.H., O.I. Aruoma, L.S. Jen, H.Y. Chung and Y.J. Surh. 2004. Ergothioneine rescues PC12 cells from beta-amyloidinduced apoptotic death. Free Radic. Biol. Med. 36:288-299.

Jianzhe, Y., M. Xiaolan, M. Qiming, Z. Yichen and W. Huaan. 1987. Icons of Medicinal Fungi from China. Science Press, Beijing.

Kaneko, I., Y. Takeuchi, Y. Yamaoka, Y. Tanaka, T. Fukuda, Y. Fukumori, T. Mayumi and T. Hama. 1980. Quantitative determination of ergothioneine in plasma and tissues by TLC densitometry. Chem. Pharm. Bull. 28:3093-3097.

Kawano, H., M. Otani, K. Takeyama, Y. Kawai, T. Mayumi and T. Hama. 1982. Studies on ergothioneine. VI. Distribution and fluctuations of ergothioneine in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **30**:1760–1765.

Kimura, C., M. Nukina, K. Igarashi and Y. Sugawara. 2005. ß– Hydroxyergothioneine, a new ergothioneine derivative from the mushroom *Lyophyllum connatum*, and Its protective activity against carbon tetrachloride-induced injury in primary culture hepatocytes. Biosci. Biotech. Biochem. 69:357-363.

Lee, I.S. and A. Nishizawa. 2003. Polyozellus multiplex, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. Life Sci. 73:3225-3234.

Lee, W.Y., E.-J. Park and J.K. Ahn. 2009. Supplementation of methionine enhanced the ergothioneine accumulation in the *Ganoderma neo-japonicum* mycelia. Appli. Biochem. Biotech. 158:213-221.

List, P.H. 1957. Occurrence of ergothioneine in shaggy-mane, *Coprinus comatus.* Archiv der Pharm. und Berich. der Deuts. Pharm. Gesell. 290/2(11): 517-20.

Mitsuyama, H. and J.M. May. 1999. Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes. Clin. Sci. 97:407-411.

Paul, B.D. and S.H. Snyder. 2009. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. Cell Death and Differen. 17:1134-1140.

Pinheiro, F., R. Faria, J.L.V. de Camargo, A.L.T. Spinardi-Barbisan, A.F. da Eira and L.F. Barbisan. 2003. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. Food Chem. Toxicol. 41:1543-1550.

Rodriguez Estrada, A.E. and D.J. Royse. 2011. Cultural practices to enhance mushroom (*Pleurotus eryngii*) yield & concentration of the antioxidants selenium & ergothioneine. Mushroom News 59:6-11.

Rodriguez Estrada, A.E., H.J. Lee, R.B. Beelman, M.D.M. Jimenez-Gasco and D.J. Royse. 2009. Enhancement of the antioxidants ergothineine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* basidiomata through cultural practices. World J. Micro. Biotech. 25:1597-1670.

Shukla, Y., O.P. Kulshrestha and K.P. Khuteta. 1981. Ergothioneine content in normal and senile human cataractous lenses. Ind. J. Med. Res. 73:472-473.

Tabata, K., W. Itoh, T. Kojima, S. Kawabate and K. Misaki. 1981. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* Fries. Carbohyd. Res. 89:121-135.

Yang, J.H., H.C. Lin and J.L. Mau. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. Food Chem. 77:229-235.