# คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden)

# Antioxidant Property, Total Phenolic Content and Prebiotic Property of Tiger Milk Mushroom (*Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden)

**พิชญาภรณ์ สุวรรณกูฏ[1*] วิชาดา นุสา[1] และ ปราณี นุ้ยหนู[2]**

**Pitchayaporn Suwanakood[1*] Wichada Nusa[1] and Pranee Nuinu[2]**

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[2]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

[1]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

[2]Department of Chemistry, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University

*E-mail: pitchayaporn.s@ubu.ac.th

Received: Oct 20, 2023

Revised: Dec 08, 2023

Accepted: Dec 12, 2023

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden)) ที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน การเตรียมตัวอย่างเห็ดนมเสือทำโดยบดให้เป็นผง แล้วนำไปสกัดด้วย 80% เอทานอล เพื่อให้ได้สารสกัดเห็ดที่มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดเห็ดดังกล่าวไปตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH radical scavenging assay และการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้วิธี Folin-Ciocalteu's method ส่วนการตรวจสอบคุณสมบัติพรีไบโอติกใช้การประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 และ *L. plantarum* TISTR 1465 ผลการศึกษา พบว่า ในแต่ละช่วงอายุของเห็ด คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอายุของเห็ดมีผลต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเห็ดนมเสือ โดยสารสกัดจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด และต่างจากสารสกัดจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 5 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าอายุของเห็ดมีผลต่อคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือด้วย โดยผงเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือนมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 และ *L. plantarum* TISTR 1465 ได้ดีกว่าผงเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 6 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดนมเสือมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและพรีไบโอติกที่อาจมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

**คำสำคัญ:** เห็ดนมเสือ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติพรีไบโอติก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

**Abstract**

This study aimed to study antioxidant property, total phenolic content and probiotic property of tiger milk mushroom (*Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden)) with the ages of 2, 3, 4, 5, and 6 months. Preparation of tiger milk mushroom samples was conducted by grinding them into powder and then extracted with 80% ethanol to obtain mushroom extracts with concentrations of 5, 25, 50, 75 and 100 µL/mL. The extracts were subjected to

antioxidant property and total phenolic content analysis. The antioxidant property was examined by DPPH radical scavenging assay. Total phenolic content was analyzed by Folin-Ciocalteu's method. Prebiotic property was examined by the assessment of growth promotion of probiotic bacteria by tiger milk mushroom powder. The probiotic bacteria used in this study were *Lactobacillus casei* TISTR 1463 and *L. plantarum* TISTR 1465. The results revealed that for each age of the mushroom, antioxidant property and total phenolic content increased depending on the mushroom extract concentrations. However, mushroom age affected its antioxidant property and total phenolic content. The 100 µL/mL extracts prepared from the mushroom with the ages of 2, 3 and 4 months had the highest antioxidant property and total phenolic content which were significantly higher than those prepared from the mushroom with the ages of 5 and 6 months. Moreover, it was found that mushroom age also affected its probiotic property. The tiger milk mushroom powder prepared from the mushroom with the ages of 2, 3 and 4 months had significantly higher ability to promote growth of *L. casei* TISTR 1463 and *L. plantarum* TISTR 1465 than that prepared from the 6-month-old mushroom. This research demonstrated that tiger milk mushroom had antioxidant and prebiotic properties that might be beneficial for further applications.

**Keywords:** Tiger milk mushroom, Antioxidant property, Prebiotic property, Total phenolic content

**1. บทนำ**

เห็ดนมเสือ (tiger milk mushroom) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden เป็นเห็ดที่มีคุณสมบัติทางยา มีส่วนของดอกเห็ดคล้ายกับดอกเห็ดหลินจือ แต่เห็ดนมเสือมีส่วนหัว (sclerotium) ฝังอยู่ใต้ดิน ซึ่งส่วนหัวนั้นเกิดจากการที่เส้นใยของเห็ดรวมตัวกันเป็นก้อน และมีสารสำคัญต่าง ๆ เช่น พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolics) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไตรเทอพีนอยด์ (triterpenoids) เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติทางยาที่ใช้ในการรักษาโรคมาแต่อดีต โดยเฉพาะโรคระบบทางเดินหายใจ จึงทำให้เห็ดนมเสือเป็นที่ต้องการในท้องตลาด [1]-[4]

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนของออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาและดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่เพื่อให้เกิดความสมดุลหรือเสถียร [5], [6] โดยสารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก พบได้มากในธรรมชาติตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ฟีนิลโปรพานอยด์ (phenylpropanoids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ไปจนถึงโครงสร้างพอลิเมอร์ (polymers) ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน (lignin) เมลานิน (melanin) และแทนนิน (tannins) เป็นต้น [7], [8]

พรีไบโอติก (prebiotic) เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน โดยสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรด เอนไซม์ และน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหาร ส่งเสริมการเจริญเติบโตและ/หรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ได้แก่ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และส่งเสริมสุขภาพที่ดีต่อผู้บริโภค เห็ดนอกจากมีประโยชน์ทางโภชนาการ และเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีแล้ว ยังอุดมไปด้วยสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก[9]-[11]

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีเห็ดหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกที่แตกต่างกัน [12], [13] โดยความแตกต่างนั้นเป็นผลมาจากปัจจัยหลายอย่าง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerus*) ที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน

**2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย**

**2.1. การเตรียมตัวอย่างผงเห็ดนมเสือ**

งานวิจัยนี้ใช้เฉพาะส่วนหัว (sclerotium) ของเห็ดนมเสือ (Figure 1) ที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน การเตรียมตัวอย่างผงเห็ดนมเสือทำโดยนำส่วนหัวของเห็ดนมเสือมาบดให้เป็นผง จากนั้นเก็บไว้ในภาชนะแห้งปิดฝามิดชิด จนกว่าจะนำไปใช้ในต่อไป

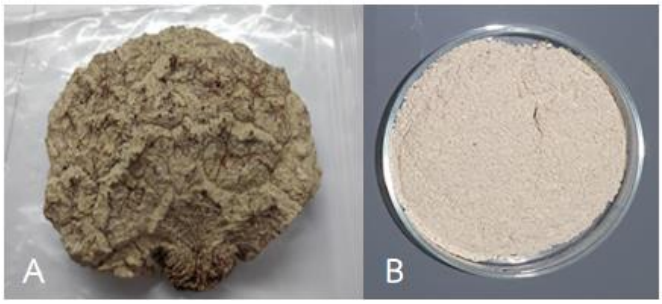



**Figure 1** Sclerotium of tiger milk mushroom
(A) before being ground, (B) after being ground

**2.2. การสกัดเห็ดนมเสือ**

การสกัดเห็ดนมเสือทำโดยใช้วิธีประยุกต์จากวิธีของ Seephonkai et al. [14] โดยนำผงเห็ดนมเสือปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงใน 80% เอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำของเหลวที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบ จากนั้นเจือจางสารสกัดที่ได้ด้วย 80% เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

**2.3. การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ**

การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดนมเสือ ใช้วิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งทำโดยเติมสารสกัดเห็ดนมเสือ (อายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ที่มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ตามสูตรดังนี้

$$\text{Radical scavenging (\%)} = 1 - \frac{\text{Abs. sample}}{\text{Abs. control}} \times 100$$

โดย

Abs. sample = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

Abs. control = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

**2.4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด**

การทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเพียง 3 ระดับในแต่ละช่วงอายุของเห็ดนมเสือ คือ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวแทนของความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดในระดับต่ำ กลาง และสูง ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ของสารสกัดเห็ดนมเสือ ใช้วิธี Folin Ciocalteu's method ซึ่งทำโดยนำสารสกัดเห็ดนมเสือ (อายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ที่มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu's regent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 7% $Na_2CO_3$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 5 มิลลิลิตร โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (µg gallic acid equivalent (GAE)/g extract)

**2.5. การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก**

การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือใช้การประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ *Lactobacillus casei* TISTR 1463 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1465

การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดนมเสือมีขั้นตอนดังนี้

**2.5.1. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย**

ทำการกระตุ้นเชื้อ *L. plantarum* TISTR 1465 และ *L. casei* TISTR 1463 จากหลอดเก็บเชื้อแห้งแข็ง โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ทำการ cross streak ลงในอาหาร MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะ microaerophile ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อแบคทีเรียเจริญบนอาหาร MRS agar ทำการเลือกโคโลนีเดี่ยว แล้วใช้ลูปถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะ microaerophile ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเพื่อให้ได้ค่าเท่ากับ 0.5

**2.5.2. การประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย**

นำหัวเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 2.5.1. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงเห็ดอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ปริมาณ 0.05 กรัม ลงในแต่ละหลอด โดยแต่การทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ บ่มในสภาวะ microaerophile ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณความสามารถในการส่งเสริมการเจริญ ตามสูตรดังนี้

$$\text{Growth promoting activity (\%)} = \frac{\text{SB - CB}}{\text{CB}} \times 100$$

โดย

CB = ค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองที่ไม่เติมผงเห็ดนมเสือ

SB = ค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองที่เติมผงเห็ดนมเสือ

**2.6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n= 3) การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 28 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองที่ได้ด้วย One Way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองด้วย Duncan New Multiple Range Test (DMRT)

**3. ผลการวิจัย**

**3.1. การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ**

จากการทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ให้มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดนมเสือที่มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 1.04±0.54 ถึง 3.96±0.82%, 1.60±0.60 ถึง 5.47±0.81%, 4.35±0.55 ถึง 6.74±0.69%, 5.30±0.77 ถึง 12.18±0.89% และ 8.99±0.83 ถึง 14.13±0.73% ตามลำดับ (Figure 2)

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ เท่ากับ 14.13, 13.91, 13.96, 11.07 และ 8.99% ตามลำดับ (Figure 3) โดยพบว่าคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มลดลงเมื่อเห็ดนมเสือมีอายุมากขึ้น และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าเห็ดนมเสือในช่วงอายุ 6 เดือน มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเห็ดนมเสือช่วงอายุอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

**3.2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด**

การทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดเพียง 3 ระดับในแต่ละช่วงอายุของเห็ดนมเสือ คือ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวแทนของความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดในระดับต่ำ กลาง และสูง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin Ciocalteu's method ของสารสกัดเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ให้มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือที่มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 7.73±0.97 ถึง 11.42±0.41, 12.78±0.41 ถึง 20.98±0.72 และ 24.58±0.83 ถึง 40.61±0.95 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ (Figure 4)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 40.61, 38.18, 39.26, 24.58 และ 28.36 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ (Figure 5) โดยพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเห็ดนมเสือมีอายุมากขึ้น และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า เห็ดนมเสือในช่วงอายุ 5 และ 6 เดือน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าเห็ดนมเสือช่วงอายุอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

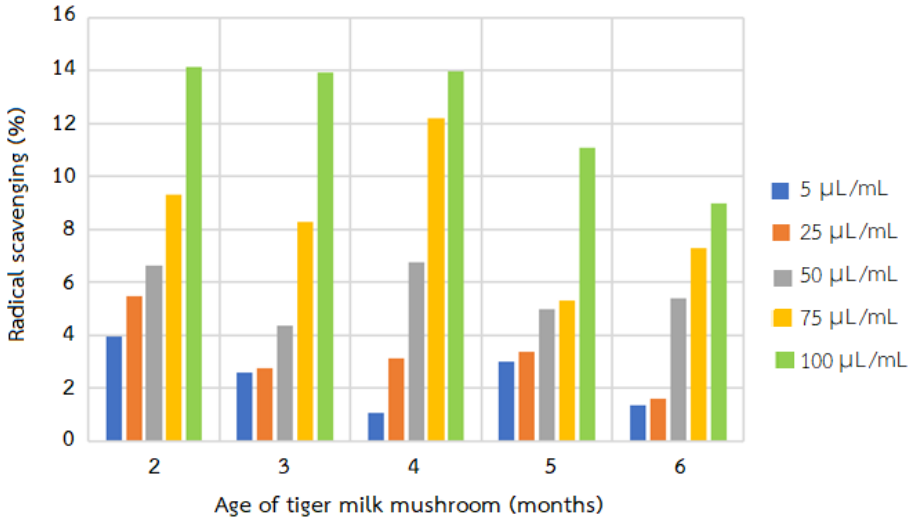



**Figure 2** Radical scavenging activity of tiger milk mushroom extracts with different concentrations prepared form tiger milk mushroom with different ages

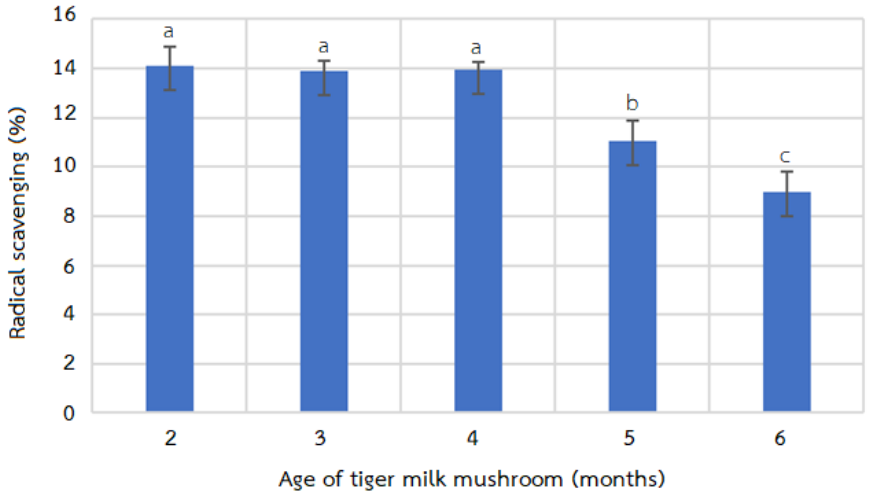



**Figure 3** Radical scavenging activity of tiger milk mushroom extracts with concentration of 100 µL/mL prepared form tiger milk mushroom with different ages

Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

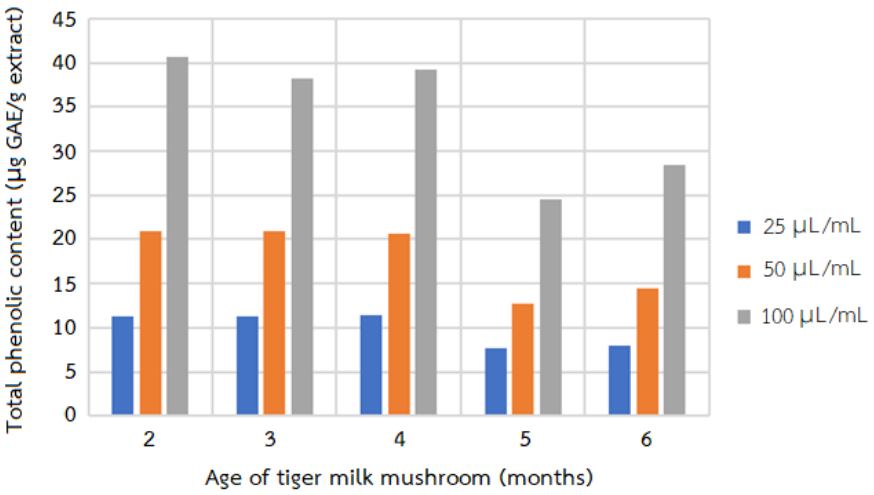



**Figure 4** Total phenolic content of tiger milk mushroom extracts with different concentrations prepared form tiger milk mushroom with different ages

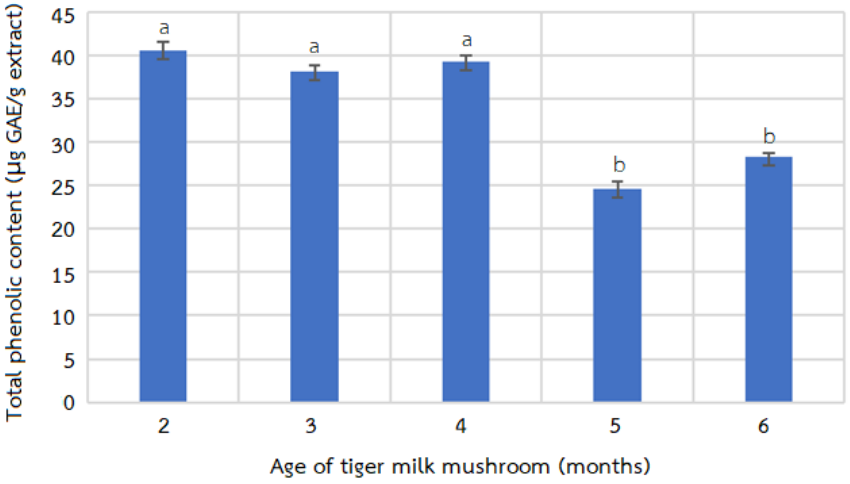



**Figure 5** Total phenolic content of tiger milk mushroom extracts with concentration of 100 µL/mL prepared form tiger milk mushroom with different ages

Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

**3.3. การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก**

การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือใช้การประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ *L. casei* TISTR 1463 และ *L. plantarum* TISTR 1465 ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีดังนี้

จากการประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 พบว่าการเติมผงเห็ดนมเสือในอาหารเหลว MRS สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 ได้ โดยมีค่าความสามารถในการส่งเสริมการเจริญ เท่ากับ 138.10, 92.86, 123.47, 86.05 และ 63.95% เมื่อเติมผงเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ (Figure 6)

จากการประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* TISTR 1465 พบว่าการเติมผงเห็ดนมเสือในอาหารเหลว MRS สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* TISTR 1465 ได้ โดยมีค่าความสามารถในการส่งเสริมการเจริญ เท่ากับ 161.11, 105.56, 147.39, 56.21 และ 43.79% เมื่อเติมผงเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ (Figure 7)

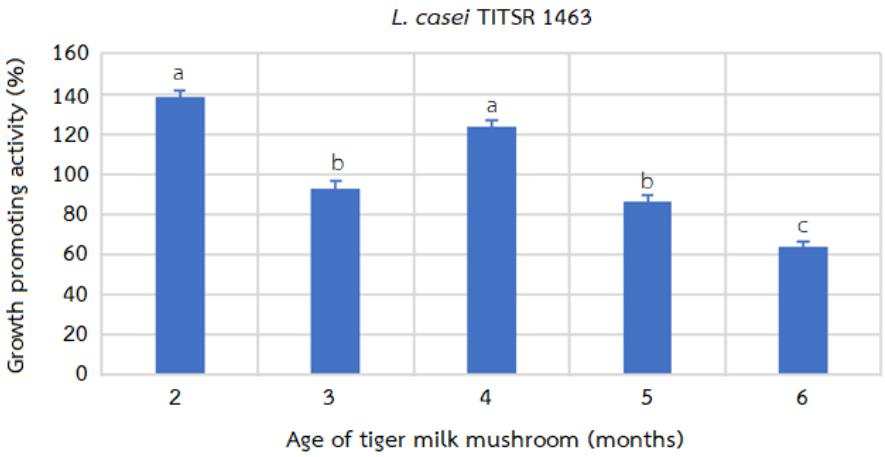



**Figure 6** Effect on growth of *L. casei* TISTR 1463 of tiger milk mushroom powder prepared form tiger milk mushroom with different ages
Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

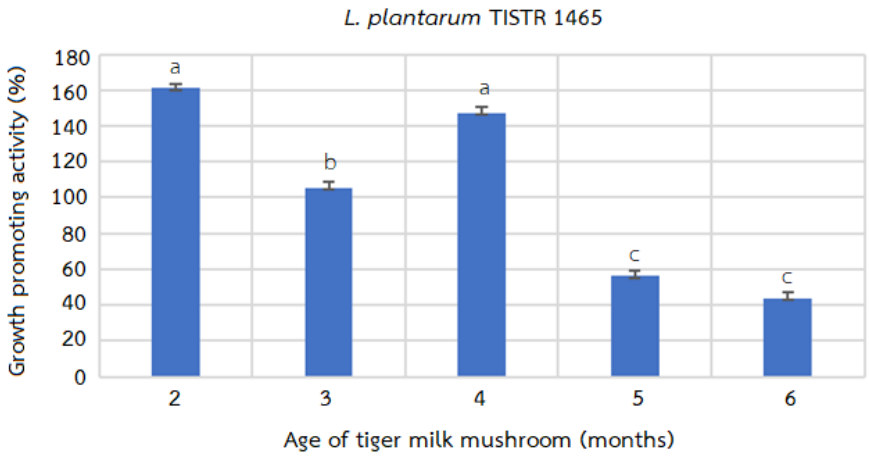



**Figure** 7 Effect on growth of *L. plantarum* TISTR 1465 of tiger milk mushroom powder prepared form tiger milk mushroom with different ages
Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$)

**4. อภิปรายผลการวิจัย**

จากการทดลองเพื่อทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือ พบว่า คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน กล่าวคือ ทั้งคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเห็ดนมเสือจะลดลงเมื่อเห็ดนมเสือมีอายุมากขึ้น ข้อมูลนี้สนับสนุนผลการวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารหลักสำคัญต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ [7], [8] อย่างไรก็ตามสำหรับเห็ดนมเสือในช่วงอายุ 5 เดือน ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าเห็ดนมเสือในช่วงอายุ 2, 3 และ 4 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลับมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระไม่ต่างจากเห็ดนมเสือในช่วงอายุ 2, 3 และ 4 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่านอกจากสารประกอบฟีนอลิกแล้ว ยังอาจมีสารอื่นที่มีผลต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ limonene, linalool and citral ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่ม non-phenolic

terpenoid components [15] ผลการทดลองนี้นำไปสู่ประเด็นที่น่าสนใจในการทำงานวิจัยต่อเพื่อศึกษาปริมาณของสารในกลุ่ม non-phenolic terpenoid components ของเห็ดนมเสือ

จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าอยู่ในช่วง 13.91 ถึง 14.13% ซึ่งถือว่ามีค่าค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสารสกัดจากเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยในงานวิจัยของ Alispahic et al. [16] พบว่าคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงสุดในเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus* var. *avellaneus*) ที่ 88.33% และน้อยที่สุดในเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus ostreatus*) ที่ 43.88% ซึ่งยังคงมากกว่าค่าที่ได้จากในงานวิจัยนี้ ความแตกต่างของคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ด นอกจากเป็นผลมาจากสายพันธุ์ของเห็ดแล้ว ยังอาจเป็นผลมาจากปัจจัยอื่น เช่น แหล่งที่มาของเห็ด ช่วงเวลาในการเก็บเห็ด หรือแม้แต่วิธีการสกัดสารจากเห็ด [17] Sengkhamparn and Phonkerd [18] ทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดผึ้งขม (*Tylopilus alboater*) ที่ผ่านกรรมวิธีให้ความร้อนที่แตกต่างกัน และพบว่าการให้ความร้อนโดยการต้มเห็ดสดเป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 70.20% ซึ่งมากกว่าเห็ดที่ไม่ได้ต้มที่ให้ค่าอยู่ที่ 62.97% ส่วนในงานวิจัยนี้มีการให้ความร้อน (40 องศาเซลเซียส) ในขั้นตอนการสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเห็ด จึงทำให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเห็ดมีค่าที่น้อย

ในงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีมากที่สุดในสารสกัดจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 38.18-40.61 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด อย่างไรก็ตามปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเห็ดนมเสือดังกล่าว ยังมีปริมาณน้อยกว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในเห็ดน้ำหมาก (65.99 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด) ซึ่งรายงานโดย Rattana and Sangsanga [19] อย่างไรก็ตามค่าที่วัดดังกล่าวนั้นไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง เนื่องจากงานวิจัยทั้งสองใช้เห็ดต่างชนิดกัน นอกจากนี้แล้วในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารสกัดจากเห็ดนมเสือที่อยู่ในรูปแบบของเหลวที่มีน้ำผสมอยู่มาก แต่งานวิจัยของ Rattana and Sangsanga [19] ใช้สารสกัดของเห็ดน้ำหมากที่อยู่ในรูปแบบของแข็งที่ผ่านกระบวนการ freeze dry ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ส่งผลให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สูงกว่าที่พบในงานวิจัยนี้

นอกจากงานวิจัยที่กล่าวมา ยังมีงานวิจัยอีกมากที่แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารจากเห็ดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เช่น Tachalerdmanee et al. [20] วัดปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดของเห็ดโบลีตส์ชนิดต่าง ๆ (Boletes mushrooms) ซึ่งผ่านกระบวนการสกัดโดยการแช่ใน 95% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วจึงนำไปผ่านกระบวนการ freeze dry ซึ่งพบว่าได้ค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 26.70-113.17 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งมากกว่าในงานวิจัยนี้เช่นกัน ในงานวิจัยของ Kaewnarin et al. [21] แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการ freeze dry สามารถให้ค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงขึ้นได้ โดยในกระบวนการสกัดดังกล่าวมีขั้นตอนการแช่ขวดสารสกัดในอ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าสารสกัดเห็ดป่าชนิดต่าง ๆ (*Russula emetica*, *Russula* sp. *Rugiboletus extremiorientalis*, *Phlebopus portentosus*) มีค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 2.13 ถึง 20.2 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด ซึ่งทั้งหมดมีค่ามากกว่าค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ Kaewnarin et al. [21] ยังพบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเห็ดป่าที่ให้ค่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ น้ำ เมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น ได้แก่ เอทานอล เมธานอล และ สารละลาย 1% HCl ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการนำมาสกัดสารจากเห็ดนมเสือ

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าในการศึกษาปริมาณของสารที่สนใจต่าง ๆ ในสารสกัดเห็ดนั้น มีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของเห็ด ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากเห็ด อัตราส่วนของเห็ดต่อตัวทำละลาย รวมถึงรายละเอียดของวิธีการสกัด ซึ่งส่งผลให้ได้ค่าของข้อมูลที่หลากหลาย ซึ่งยากต่อการนำมาเปรียบเทียบ ดังนั้นหากต้องการเปรียบเทียบผลของเห็ดที่ต้องการศึกษากับผลของเห็ดชนิดใด ควรมีการกำหนดปัจจัยต่าง ๆ ให้สอดคล้องกัน

จากการประเมินความสามารถของผงเห็ดนมเสือในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก พบว่า ผง

เห็ดนมเสืออายุ 2 และ 4 เดือน สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก (*L. casei* TISTR 1463 และ *L. plantarum* TISTR 1465) ได้ดีที่สุด โดยมีค่าความสามารถในการส่งเสริมการเจริญ อยู่ในช่วง 123.47 ถึง 161.11% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับค่าที่ได้จากการทดลองกับเห็ดในกลุ่มเห็ดระโงก (*Amanita* spp.) พบว่ามีค่าไม่ต่างกันมาก โดยความสามารถของส่วนก้านเห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner & Bas.) ในการส่งเสริมเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 มีค่าเท่ากับ 173.41% และความสามารถของส่วนหมวกเห็ดระโงกเหลือง (*A. hemibapha* subsp. *javanica* Corner & Bas) ในการส่งเสริมเจริญของ *L. plantarum* TISTR 1465 มีค่าเท่ากับ 178.74% [19]

## 5. บทสรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerus*) โดยนำเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน มาบดเป็นผง แล้วนำไปเตรียมเป็นสารสกัดที่มีความเข้มข้น 5, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 80% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากการศึกษาพบว่าอายุของเห็ดนมเสือมีผลต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกของเห็ดนมเสือ กล่าวคือ เห็ดนมเสือที่มีอายุมากขึ้น (มากกว่า 4 เดือน) จะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติพรีไบโอติกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดจากเห็ดที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด และต่างจากสารสกัดจากเห็ดที่มีอายุ 5 และ 6 เดือน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผงเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 2, 3 และ 4 เดือนก็มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของ *L. casei* TISTR 1463 และ *L. plantarum* TISTR 1465 ได้ดีกว่าผงเห็ดนมเสือที่เตรียมจากเห็ดนมเสือที่มีอายุ 6 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดนมเสือมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและพรีไบโอติกที่อาจมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

## 6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณบริษัท เค.พี.พีคอนซัลแทนท์ แอนด์ เซอร์วิส จำกัด สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างเห็ดนมเสือ

## 7. References

[1] Nallathamby, N. and et al. 2018. A status review of the bioactive activities of tiger milk mushroom *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryvarden. **Frontiers in Pharmacology.** 8: 998.

[2] Tan, E.S.S., Leo, T.K. and Tan, C.K. 2021. Effect of tiger milk mushroom (*Lignosus rhinocerus*) supplementation on respiratory health, immunity and antioxidant status: an open-label prospective study. **Scientific Reports.** 11: 11781.

[3] Johnathan, M. and et al. 2016. Phytochemical profiles and inhibitory effects of tiger milk mushroom (*Lignosus rhinocerus*) extract on ovalbumin-induced airway inflammation in a rodent model of asthma. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 16: 167.

[4] Soontharapirakkul, K. and Kotpat, T. 2022. **Development of Soil Cultivation of Medicinal Mushrooms (*Lignosus rhinocerus*) to Stimulate the Growth and Biological Activity of Tiger Milk Mushroom Sclerotia.** Research Report, King Mongkut's University of Technology Thonburi. (*in Thai*)

[5] Wansutha, S. and Yunyaw, L. 2018. Antioxidant properties of probiotics. **Journal of Traditional Thai Medical Research.** 4(1): 1-19. (*in Thai*)

[6] Martemucci, G. and et al. 2022. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. **Oxygen.** 2(2): 48-78

[7] Dehghanian, Z. and et al. 2022. Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. **Heliyon.** 8(3): e09094.

[8] Kumar, N. and Goel, N. 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports.** 24: e00370.

[9] Bamigbade, G.B. and et al. 2022. An updated review on prebiotics: Insights on potentials of food seeds waste as source of potential prebiotics. **Molecules.** 27(18): 5947.

[10] You, S. and et al. 2022. The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. **Frontiers in Nutrition.** 9: 1000517.

[11] Al-Sheraji, S.H. and et al. 2013. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods.** 5(4): 1542-1553.

[12] Inyod, T. and et al. 2022. Antioxidant activities and prebiotic properties of the tropical mushroom *Macrocybe crassa*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.** 27: 100298.

[13] Fernandes, A. and et al. 2023. Exploring mushroom polysaccharides for the development of novel prebiotics: A review. **International Journal of Medicinal Mushrooms.** 25(2): 1-10.

[14] Seephonkai, P. and et al. 2011. DPPH radical scavenging activity and total phenolics of *Phellinus* mushroom extracts collected from northeast of Thailand. **Chinese Journal of Natural Medicines.** 9(6): 441-445.

[15] Baschieri, A. and et al. 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. **Food Chemistry.** 232: 656-663.

[16] Alispahic, A. and et al. 2015. Phenolic content and antioxidant activity of mushroom extracts from Bosnian market. **Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina.** 44: 5-8.

[17] Sharpe, E. and et al. 2021. Comparison of antioxidant activity and extraction techniques for commercially and laboratory prepared extracts from six mushroom species. **Journal of Agriculture and Food Research.** 4: 100130.

[18] Sengkhamparn, N. and Phonkerd, N. 2014. Effects of heat treatment on free radical scavenging capacities and phenolic compounds in *Tylopilus alboater* wild edible mushrooms. **Chiang Mai Journal of Science.** 41: 1241-1249.

[19] Rattana, T. and Sangsanga, T. 2016. Antioxidant and prebiotic properties of Sakaerat wild edible mushrooms. **Thai Science and Technology Journal.** 24(4): 538-550. (*in Thai*)

[20] Tachalerdmanee, P. and et al. 2016. Effect of total phenolic content on free radical scavenging activities of Boletes mushroom extracts. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.** 40: 88-91.

[21] Kaewnarin, K. and et al. 2016. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. **Journal of Functional Foods.** 27: 352-364.