

สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร จากไมซีเลียมและอาหารเลี้ยงเห็ดป่า

Antioxidant and Anti-food Pathogen Properties in Food from Mycelium Culture of Wild Mushroom

ธารทิพย์ รัตน์ระ* และธนากร แสงสง่า

หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

Tarntip Rattana* and Thanakorn Saengsanga

Environmental Science Program, Faculty of Science and Technology,

Nakhon Ratchasima Rajabhat University, Nai Muang, Muang, Nakhon Ratchasima 30000

บทคัดย่อ

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่า และสารสกัดที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่า จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner & Bas.) เห็ดระโงกเหลือง [*A. hemibapha* (Berk. et Br.) Sacc. subsp. *javanica* Corner et Bas.] เห็ดขมิ้นเล็ก (*Cantharellus minor* Peck.) เห็ดขมิ้นใหญ่ [*Craterellus oderatus* (Schw.) Fr.] และเห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lev.) การศึกษานี้วัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด เบต้าแคโรทีน โคลีน และวัดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเส้นใยเห็ดบดมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมี IC_{50} เท่ากับ 81.23, 90.92 และ 95.18 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่า vitamin C ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 34.09 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดน้ำเลี้ยงที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่า แต่ทั้งในสารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเส้นใยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้สูงในเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใย คือ เห็ดระโงกขาวในระดับความเข้มข้นที่ 25 และ 50 mg/mL คือ เห็ดบด เท่ากับ 54.25 และ 78.25 mg GAE/g ตามลำดับ ส่วนสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยสกัดไม่สร้างบริเวณโซนใสต่อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 8739 สารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยสกัดเห็ดขมิ้นใหญ่มีการสร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 11 ± 0.15 มิลลิเมตร และสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยสกัดเห็ดบดมีการสร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 8.3 ± 0.17 มิลลิเมตรในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 6538 ในส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดบดมีการ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : rattana.tarntip@gmail.com

doi: 10.14456/tstj.2020.178

สร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 18 ± 0.05 มิลลิเมตร ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 น้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดขมิ้นใหญ่มีการสร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 10 ± 0.05 มิลลิเมตรต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 6538 ส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดไม่มีการสร้างบริเวณโซนใสต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 8739

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ; แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Abstract

The antioxidant and antimicrobial properties were studied in mycelia and culture broths of five wild edible mushrooms, i.e. *Amanita princeps* Corner & Bas., *A. hemibapha* (Berk. Et Br. Sacc. Subsp. *javanica* Corner et Bas.), *Cantharellus minor* Peck., *Craterellus oderatus* (Schw.) Fr., and *Lentinus polychrous* Lev. This study measured DPPH radical scavenging activity, total phenolic content, β -carotene, lycopene, and antimicrobial activity by paper disc diffusion method. It was found that *L. polychrous* Lev. had IC_{50} values of 81.23, 90.92 and 95.18 %, at concentrations of 15, 25 and 50 mg/mL, respectively, which were higher than that of vitamin C (34.09 %). The antioxidant of the culture broth extract by ethanol was less than that of the mycelium extract. Moreover, the mycelium of *L. polychrous* Lev., 25 and 50 mg/mL, showed the highest total phenolic contents as 54.25 and 78.25 mg GAE/g, respectively. The mycelium and culture broth were tested for growth inhibitory activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739. It was found that the mycelia of five wild mushrooms were unable to inhibit the growth of the tested bacteria. The culture broth extract and culture broth of *C. oderatus* (Schw.) Fr. inhibited highest clear zone against *E. coli*, as 11 ± 0.15 and 10 ± 0.05 mm, respectively. The culture broth extract and culture broth of *L. polychrous* Lev. inhibited highest clear zone against *S. aureus* and *B. subtilis*, as 8.3 ± 0.17 and 18 ± 0.05 mm, respectively.

Keywords: antioxidant; food pathogen bacteria

1. บทนำ

ประโยชน์จากการบริโภคเห็ดนั้นเราทราบกันมานานแล้ว ผลิตภัณฑ์เห็ดชนิดต่าง ๆ ถูกใช้เป็นอาหารเสริมหรือยาเป็นเวลามากกว่า 2,000 ปี ในประเทศตะวันออกไกล (จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และบางส่วนของรัสเซีย) [1] ในทางกลับกันโลกฝั่งตะวันตกมีการเริ่มบริโภคเห็ดเนื่องจากรสชาติและกลิ่นของเห็ด เมื่อไม่กี่ปีมานี้ นักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับแหล่ง

สารประกอบทางชีวภาพที่มีผลต่อการทำงานของร่างกายมนุษย์ ซึ่งผลการศึกษาทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ mycopharceutical หรือ fungal supplement ออกวางจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้จัดเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพซึ่งสารอาหารและสารที่มีสมบัติทางยาที่พบมากในเห็ดเป็นโปรตีน เส้นใย และโพลีแซคคาไรด์ และยังพบสารจำพวก glycolipid sesquiterpene และสารที่มีฤทธิ์

ทางชีวภาพอื่น ๆ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยับยั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส [2]

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดนั้นมีข้อจำกัดด้านฤดูกาล เวลา แรงงาน พื้นที่เพาะเลี้ยง ความบริสุทธิ์ของเห็ดในสภาพสิ่งแวดล้อมปกติ และปริมาณผลผลิตที่ได้ สิ่งเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการนำไปประยุกต์ใช้หรือพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบบอื่น ๆ ซึ่งการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่ทำให้ได้เส้นใยเห็ดคุณภาพดีในปริมาณมากที่สุด [3] ด้วยเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงแบบนี้จะทำให้ได้เส้นใยเห็ดที่มากกว่าในช่วงเวลาที่สั้นกว่า ในพื้นที่ที่จำกัด และมีการปนเปื้อนน้อยหรือไม่มีการปนเปื้อนเลย [4] นอกจากนี้ยังมีความต้องการสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ที่ได้จากเส้นใยหรือเห็ดในปริมาณมากทั้งด้านสารอาหารและยาที่จะนำไปใช้ประโยชน์ โดย exopolysaccharide นั้นพบได้ในโครงสร้างด้านนอกของเซลล์สิ่งมีชีวิตจำพวกโพรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งโพลีแซคคาไรด์นี้มีความหลากหลายและซับซ้อนของโครงสร้างทางเคมี [5] และในปี ค.ศ. 2007 นั้น Lee และคณะ [6] รายงานว่าการผลิตโพลีแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดรา *Lentinus squarrosulus* ในอาหารเหลว และได้ศึกษาสมบัติของเส้นใยพบว่าเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และพบ β -glucan ปริมาณสูงภายในเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเส้นใยหรือโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเหลวจึงนับเป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตในปริมาณมากและในช่วงเวลาที่รวดเร็วขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจเพาะเลี้ยงเห็ดระโงกขาว เห็ดระโงกเหลือง เห็ดขมิ้นเล็ก เห็ดขมิ้นใหญ่ และเห็ดบดในอาหารเหลว

และศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์ของเห็ดและฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สายพันธุ์เห็ด

เห็ด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ (1) เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner and Bas.) (2) เห็ดระโงกเหลือง [*A. hemibapha*(Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. *Javanica* Corneret bas.] (3) เห็ดขมิ้นเล็ก (*Cantharellus minor* Peck.) (4) เห็ดขมิ้นใหญ่ (*Craterellus oderatus* (Schw.) Fr.) และ (5) เห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lev.)

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียแกรมบวก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 กับ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 และแบคทีเรียแกรมลบ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 8739

2.3 การเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ด

เก็บรวบรวมเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งธรรมชาติ จากนั้นแยกเชื้อเห็ดบริสุทธิ์โดยใช้มีดที่ฉีดยาฆ่าเชื้อผ่าดอกเห็ดแล้วฉีกออกเป็น 2 ส่วน ใช้มีดที่ฆ่าเชื้อแล้วตัดชิ้นเนื้อภายในดอกเห็ดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำชิ้นเนื้อเห็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDB) บ่มเชื้อประมาณ 3-5 วัน

2.4 การเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปรับปรุงจากวิธีของ Somongkon และคณะ [8] โดยนำ Cork borer ขนาดหมายเลข 3 เจาะเส้นใยเห็ดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จำนวน 3 ชิ้น ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 50 mL นำไปเลี้ยง

ใน incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 5 วัน ถ่ายเส้นใยเห็ดทั้งหมดที่เจริญลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 100 mL แล้วเลี้ยงที่สภาวะเดิมต่อเนื่องเป็นเวลา 15 วัน เพื่อเพิ่มอาหารให้เชื้อเจริญเติบโต

2.5 การสกัดสารจากเส้นใยเห็ดและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ด

การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยนำเส้นใยเห็ดที่อบแห้ง 10 g ใส่ในเอทานอล 100 mL นำส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ด 10 mL ใส่เอทานอล 100 mL แฉะทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman® No. 4 แล้วนำของเหลวที่ได้จากการกรองไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporate ที่ 40 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้จากการระเหยจะถูกนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป [9] และส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่ไม่ได้สกัดด้วยเอทานอลจะถูกกรองด้วยกระดาษกรอง membrane CN (Whatman®) 0.45 µm Memb และนำไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร

2.6. ทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH radical scavenging activity

การทดสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดป่าปรับปรุงจากวิธีของ Seephonkai และคณะ [10] นำสารตัวอย่างที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นมาตัวอย่างละ 3 mL ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน DPPH 0.3 mM ปริมาตร 1.0 mL ลงในหลอดทดลองนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์โดยใช้สารละลาย DPPH 0.3 mM ร่วมกับเอทานอลเป็น blank และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล

อิสระ DPPH ที่ 50 % (IC₅₀) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน vitamin C คำนวณดังสมการ

$$\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} \div \text{Abs}_{\text{blank}})] \times 100$$

โดย Abs_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH; Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน (vitamin C)

2.7 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด [11]

วิธี total phenolic content (Folin-Ciocalteu method) นำสารสกัดเห็ดที่มีความเข้มข้น 25 mg/mL ปริมาตร 200 µL ใส่ลงในหลอดทดลองเติม 1.0 mL ของ 10 % Folin-Ciocalteu reagent จากนั้นใส่ 1.0 mL ของ 7 % Na₂CO₃ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 5 mL เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำ 3 ครั้ง นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกรดแกลกิกมาตรฐาน

2.8 วิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีน [12]

นำสารสกัดเส้นใยเห็ด 100 mg เติมน้ำ 10 mL ของอะซิโตนและเฮกเซน (92:3) เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No. 4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 453, 505 และ 663 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนที่ได้จากสูตร

$$\text{Lycopene (mg/100mg)} = 0.0458 A_{663} + 0.372 A_{505} - 0.0806 A_{453}$$

$$\beta\text{-carotene mg/100mg} = 0.216 A_{663} - 0.304 A_{505} + 0.452 A_{453}$$

2.9 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเห็ดชนิดต่าง ๆ ต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใช้วิธีทดสอบแบบ paper disc diffusion ปรับปรุงจากวิธีของ Srisukong และคณะ [13] นำแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *B. Subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538 และ *E. coli* ATCC 8739 ที่ใช้ทดสอบมาเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิ ต่ำ นำเชื้อมาเจือจางมีปริมาณเชื้อ 10^4 CFU/mL จากนั้นนำแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้ง 3 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหาร nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดในปริมาณ 1 mL ใส่ในโซเดียมคลอไรด์ที่มีปริมาตร 9 mL ในอัตราส่วน 1:10 ซึ่งมีความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ ซึ่งจะดูจากความเข้มข้น 10^{-1} ไปยัง 10^{-5} จนถึง 10^{-5} โดยดูดในปริมาตร 0.1 mL จากนั้นนำไป spread plate เริ่มที่ความเข้มข้น 10^{-3} ไปจนถึง 10^{-5} โดย spread plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีเมื่อได้ความเข้มข้น 10^4 CFU/mL นำกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มในสารสกัดและวางบนอาหาร nutrient agar ที่มีแบคทีเรียทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลโดยวัดบริเวณโซนใสโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางหน่วยเป็นมิลลิเมตร

2.10 วิเคราะห์ข้อมูลและค่าความแปรปรวนทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลและความแปรปรวนด้วยวิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการวิจัย

3.1 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 mg/mL ของเห็ดแต่ละชนิด พบว่าเส้นใยเห็ดป่าทั้ง 5 ชนิด ในทุกความเข้มข้นมีค่า IC_{50} มากกว่าสารมาตรฐาน vitamin C แต่เห็ดบดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 81.23, 90.92 และ 95.18 ที่ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 mg/mL ตามลำดับ โดยค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ของ vitamin C ที่มีค่า 34.091 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 1

ส่วนอาหารเหลว PDB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่าเมื่อนำไปวิเคราะห์ แสดงดังรูปที่ 2 เห็นได้ว่าในน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่า 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 mg/mL มีค่า IC_{50} มากกว่าสารมาตรฐาน vitamin C แต่เห็ดบดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระมาก 65.72, 76.58 และ 90.92 ที่ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 mg/mL ตามลำดับ

3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การทดลองนี้จะใช้เส้นใยและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดระโงกขาว ระโงกเหลือง เห็ดขมิ้นเล็ก เห็ดขมิ้นใหญ่ และเห็ดบดที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/mL มาวัดค่าดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกในสมการของมาตรฐาน gallic acid ค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงและคำนวณปริมาณฟีนอลิกได้ดังรูป 3 และ 4

ผลปรากฏว่าเห็ดที่มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดของสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใย คือ เห็ดระโงกขาว ที่ระดับความเข้มข้นที่ 25 mg/mL เท่ากับ 36.50 mg GAE/g ที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 และ 100 mg/mL คือ เห็ดบด 54.25 และ 78.25 mg GAE/g ตามลำดับ

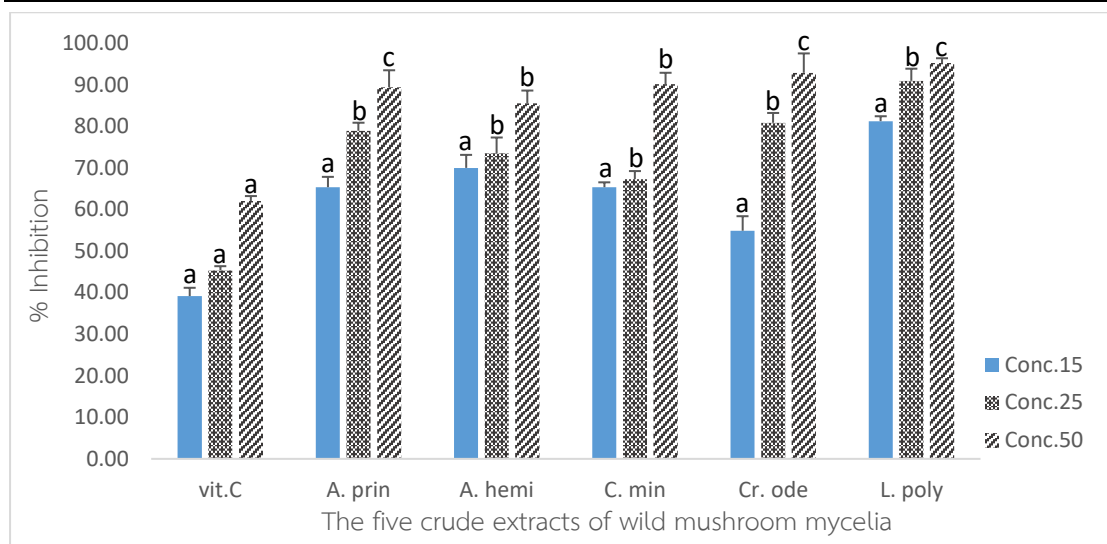


Figure 1 Antioxidant activities (as percentages) of vitamin C and 5 wild mushroom mycelia: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. *Javanica* Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck.: *C. min*) [*Cra. oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-c) represent significant difference ($p < 0.05$) between various concentrations within a treatment.

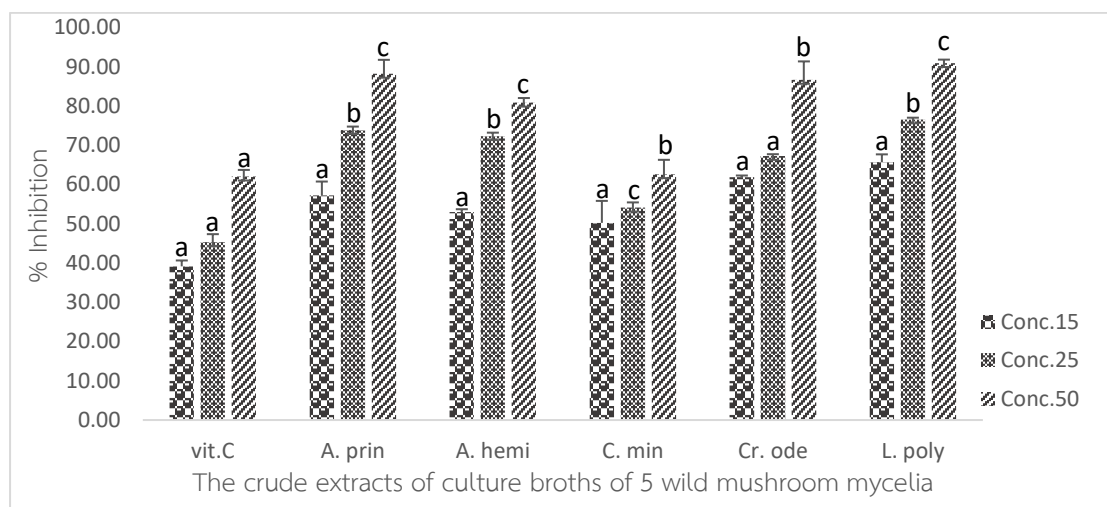


Figure 2 Antioxidant activities (as percentages) of the 5 wild mushroom culture broths in various concentrations.: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. *Javanica* Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck.: *C. min*) [*Cra. oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-c) represent significance difference ($p < 0.05$) between various concentrations within a treatment.

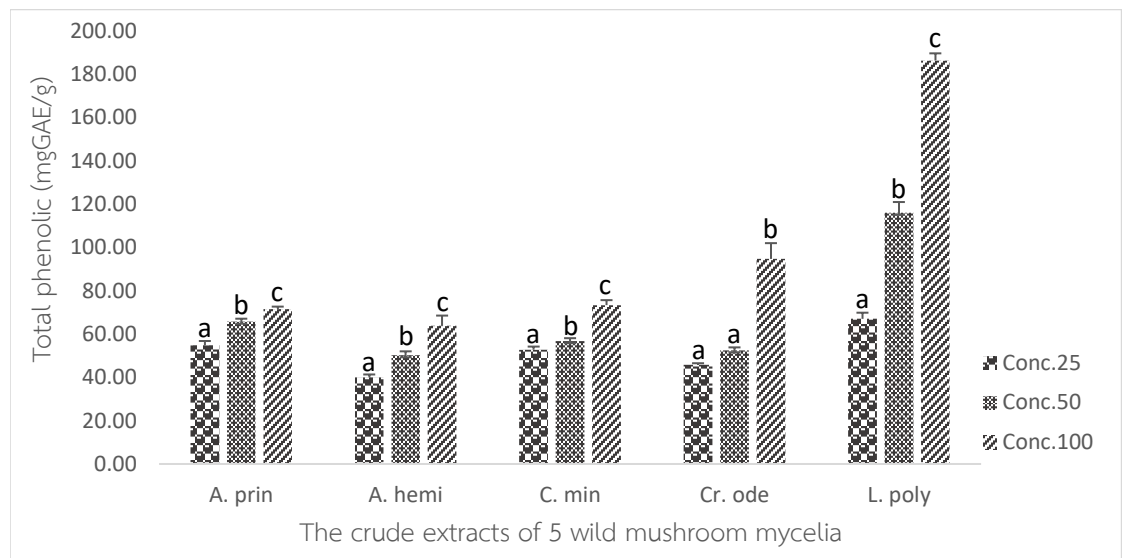


Figure 3 Total phenolic contents of 5 wild mushroom mycelia: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. Javanica Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck: *C. min*) [*Cra. oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-c) represent significant difference ($p < 0.05$) between various concentrations within a treatment.

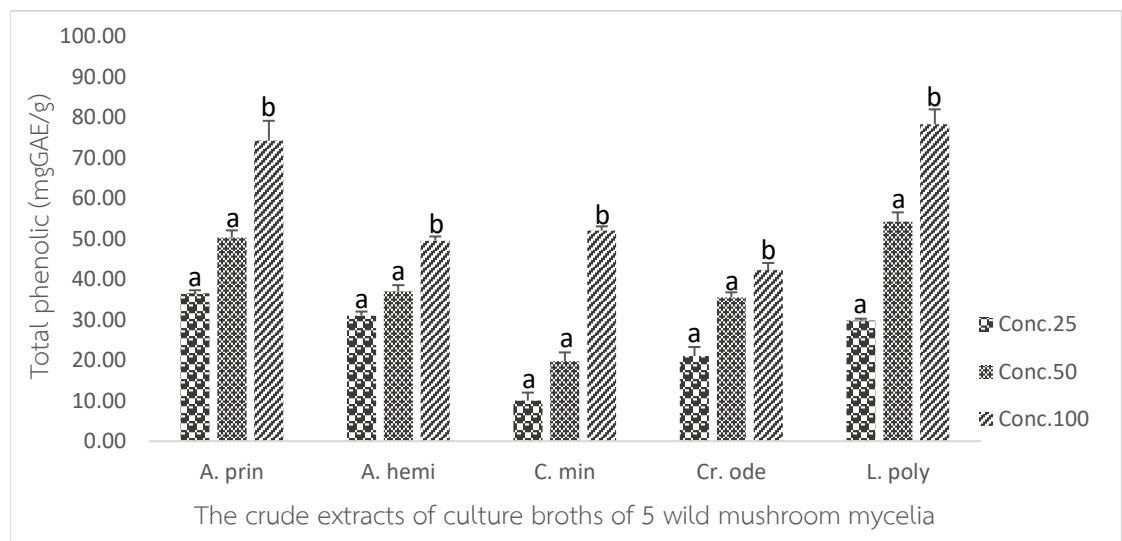


Figure 4 Total phenolic contents of 5 culture broth in wild mushroom mycelia: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. Javanica Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck: *C. min*) [*Cra. Oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-c) represent significant difference ($p < 0.05$) between various concentrations within a treatment.

3.3 วิเคราะห์ปริมาณสารเบต้าแคโรทีนและไลโคปีน

พบว่าเห็ดระโงกเหลืองมีค่าไลโคปีนสูงที่สุด (0.022 mg/100 mg) และเห็ดระโงกเหลืองกับเห็ดขมิ้นเล็กมีค่าเบต้าแคโรทีนสูงที่สุด (0.028 mg/100 mg) ดังรูปที่ 5 และ 6

ส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยพบว่าเห็ดระโงกขาวมีค่าไลโคปีนสูงที่สุด (0.087 mg/100 mg) และเห็ดระโงกขาวมีค่าเบต้าแคโรทีนสูงที่สุด (0.087 mg/100 mg) ดังรูปที่ 6

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดและน้ำเลี้ยงใช้วิธีทดสอบแบบ paper disc diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด โดยวิธีการ paper disc

diffusion แล้วตรวจวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นรอบวงบริเวณโซนใส

การทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้วิธีการ paper disc diffusion พบว่าไม่เกิดโซนใสในการทดสอบกับ *B. Subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus* แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเส้นใยที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลไม่สามารถสร้างบริเวณโซนใส

การทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้วิธี Paper disc diffusion พบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสใน *S. aureus* และ *E. coli* แสดงให้เห็นว่า *E. coli* ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดขมิ้นใหญ่ โดยมีการสร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 11 มิลลิเมตร และ *S. aureus* ถูกยับยั้งโดยสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดอบมีการสร้างบริเวณโซนใสมากที่สุด คือ 8.3 มิลลิเมตร และสารสกัดน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์ไม่สร้างบริเวณโซนใสใน *B. subtilis* ดังแสดงในตารางที่ 1

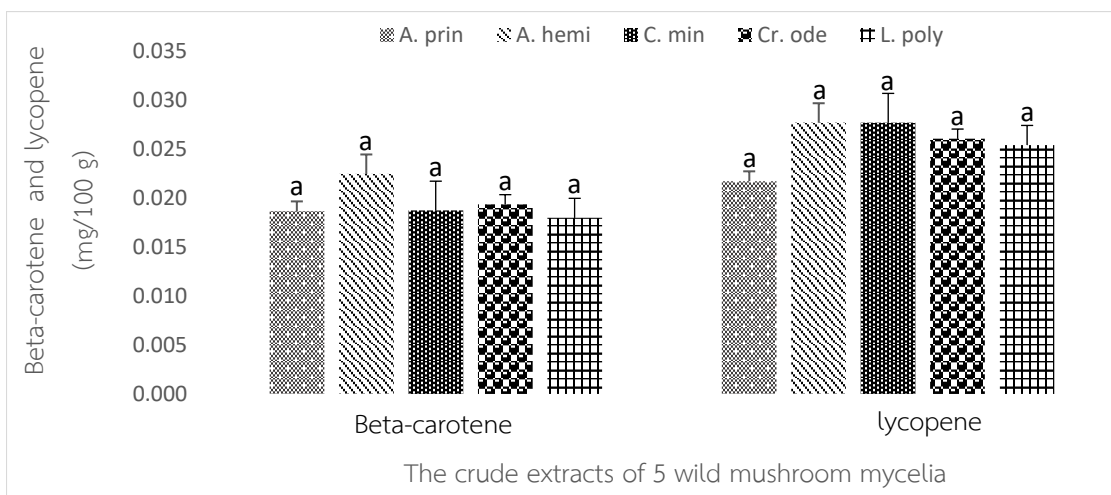


Figure 5 Beta-carotene and lycopene contents of 5 wild mushroom mycelia: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. Javanica Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck.: *C. min*) [*Cra. oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-e) represent significant difference ($p < 0.05$) between various mushroom species within a treatment.

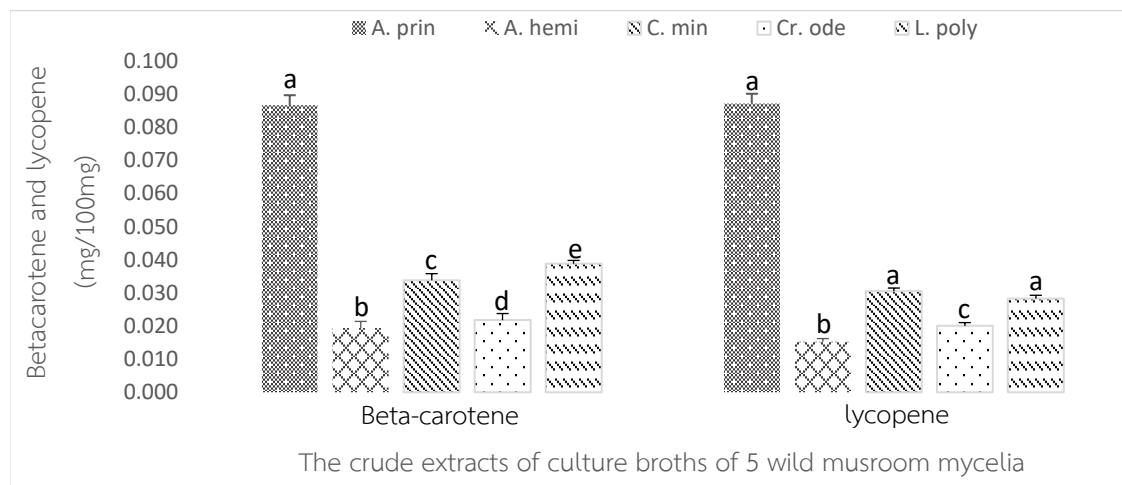


Figure 6 Beta-carotene and lycopene contents of 5 culture broths of wild mushrooms: (*A. princeps* Corner and Bas.: *A. prin*) [*A. hemibapha* (Berk. Et Br.) Sacc. Subsp. Javanica Corneret bas.: *A. hem*] (*C. minor* Peck.: *C. min*) [*Cra. oderatus* (Schw.) Fr.: *Cra. Ode*] (*L. polychrous* Lev.: *L. poly*). The different letters above the column (a-e) represent significant difference ($p < 0.05$) between various mushroom species within a treatment.

Table 1 Antibacterial activity of culture broth extracts harvested from 5 wild mushrooms

Culture broth extracts	Inhibition zone diameters (mm)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. princeps</i>	0	0	0
<i>A. hemibapha</i>	0	0	0
<i>C. minor</i>	0	6.5±0.09	7.3±0.05
<i>C. oderatus</i>	0	11±0.15	0
<i>L. polychrous</i>	0	0	8.3±0.17

Table 2 Antibacterial activity of culture broth harvested from 5 wild mushrooms

Culture broths	Inhibition zone diameters (mm)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>A. princeps</i>	0	0	0
<i>A. hemibapha</i>	0	0	0
<i>C. minor</i>	11.8±0.5	0	9.3±0.12
<i>C. oderatus</i>	7±0.08	0	10±0.05
<i>L. polychrous</i>	18±0.05	0	6.5±0.01

การทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้วิธีการ paper disc diffusion พบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณ โชนใสใน *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดบดมีการสร้างบริเวณโชนใสมากที่สุด คือ 18 ± 0.05 มิลลิเมตร ต่อการยับยั้ง *B. subtilis* และน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดขมิ้นใหญ่มีการสร้างบริเวณโชนใสมากที่สุด คือ 10 ± 0.05 มิลลิเมตรต่อการยับยั้ง *S. aureus* โดยน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดทุกสายพันธุ์ไม่มีการสร้างบริเวณโชนใสในการยับยั้ง *E. coli* ดังแสดงในตารางที่ 2

4. วิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่าในอาหารเหลวเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้ได้ผลผลิตเส้นใยออกมานอกฤดูกาลที่เห็ดป่าออกดอกได้ หลังจากที่ได้เส้นใยจากการทดลองเลี้ยงเห็ดป่าหลายสายพันธุ์ในอาหารเหลวภายในห้องปฏิบัติการแล้ว จึงนำเส้นใยและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดมาศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร การศึกษาครั้งนี้ได้ประเมินหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารของแบคทีเรียแกรมบวกและลบของเส้นใยและน้ำเลี้ยงของเห็ดป่าทั้ง 5 ชนิด ซึ่งพบว่าปริมาณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ของเส้นใยเห็ดทั้ง 5 ชนิด มีค่าสูงกว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน vitamin C แต่ในเส้นใยและน้ำเลี้ยงเห็ดบดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงสุดและมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเช่นเดียวกับรายงานของ Fangkrathok และคณะ [14] ได้รายงานการพบสารประกอบชีวภาพต้านอนุมูลอิสระในเส้นใยเห็ดบด ได้แก่ polyhydroxyoctane, 6-methylheptane-1,2,3,4,5-pentaol และ ergostanoids 5 ชนิด คือ (22E,24R)-ergosta-7, 22-dien-3 β , 5 α , 6 β -triol (1) 3 β , 5 α -dihydroxy-(22E, 24R)-ergosta-7, 22-dien-6-one (2) ergosta-4, 6, 8(14), 22-

tetraen-3-one (3) (3 β , 5 α , 8 α , 22E)-5, 8-diepoxy-ergosta-6, 22-dien-3-ol(4) และ 5, 8-epidioxy-(3 β , 5 α , 8 α , 22E)-ergosta-6, 9(11), 22-trien-3-ol (5) นอกจากนั้น Sirival [15] ยังได้รายงานว่าในเส้นใยเห็ดบดยังพบสารประกอบฟีนอล ได้แก่ catechin, tannic acid, gallic acid, quercetin, isoquercetin, eriodictyol, kaempferol เป็นต้น โดยสารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการส่งเสริมสุขภาพอีกด้วย

การทดสอบเส้นใยและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่าต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ส่วนของเส้นใยเห็ดป่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ แต่ในน้ำเลี้ยงเส้นใยที่สกัดและไม่สกัดด้วยเอทานอลของเห็ดป่าหลายชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี โดยน้ำเลี้ยงเห็ดขมิ้นเล็ก (*C. minor* Peck) พบว่ามีขนาดวงใส 11.8 มิลลิเมตร ในน้ำเลี้ยงเส้นใยที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลต่อ *B. subtilis* โดยในส่วนของน้ำเลี้ยงเส้นใยพบว่าเห็ดบด (*L. polychrous* Lev.) มีขนาดวงใสมากที่สุด (18 มิลลิเมตร) ส่วนของการเกิดวงใสเมื่อทดสอบกับ *E. coli* นั้น น้ำเลี้ยงเห็ดเห็ดขมิ้นใหญ่ที่ถูกสกัดด้วยเอทานอลให้วงใสมากที่สุด (11.8 มิลลิเมตร) ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Imtiaj และ Tae-Soo [16] ที่พบว่าน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดเกาหลี่หลายชนิดสามารถสร้างวงใสในการยับยั้ง *E. Coli*, *P. aeruginosa* และ *S. Aureus* โดยมีขนาดวงใส 0-13.33 มิลลิเมตร

5.สรุป

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่าทั้งห้าชนิดในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีค่าที่สูง ทั้งในเส้นใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและน้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ด ซึ่งสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่นำมาทดสอบของ

เส้นใยพบว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ แต่ น้ำเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ดังนั้นการ เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดป่าในครั้งนี้อาจนำไปเป็นแนวทาง ในการประยุกต์ใช้ในการผลิตเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ หรือเป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อลดแบคทีเรียก่อโรคใน อาหารรวมทั้งเพิ่มคุณค่าให้ผลิตภัณฑ์อาหารประเภท ต่าง ๆ ได้ในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุน ทุนในการทำวิจัย โครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2561 ทำให้การศึกษาวินิจฉัยนี้สามารถดำเนินการจน สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

7. References

- [1] Chang, S. T. and Buswell, J. A. , 1996, Mushroom nutraceuticals, World J. Microb. Biotech. 12: 473-476.
- [2] Wasser, S.P. and Weis, A.L., 1999, Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: A modern perspective, Crit. Rev. Immunol. 19: 65-96.
- [3] Tang, Y.J. and Zhong, J.J. , 2002, Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharides & ganoderic acid, Enzyme Microb. Tech. 31: 20-28.
- [4] Yang, F. C and Liau, C. B. , 1998, The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged culture, Proc. Biochem. 33: 547-553.
- [5] Lin, E. and Chen, Y., 2007, Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media, Bioresour. Technol. 98, 2511-2517.
- [6] Lee, W.Y., Park, Y., Ahn, J.K., Ka, K.H. and Park, S.Y., 2007, Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*, Enzyme Microb. Technol. 40: 249-254.
- [7] Ahmad, R., Muniandy, S., Shukri, N.I.A., Alias, A.A.H., Yusoff, W.M.W., Senafi, S. and Daud, F., 2014, Antioxidant properties and glucan compositions of various crude extract from *Lentinus squarrosulus* mycelial culture, Adv. Biosci. Biotechnol. 5: 805-814.
- [8] Somongkon, R., Moonmangmee, D. and Moonmangmee, S. , 2007, Study on antioxidant and free radical scavenging activity of polysaccharide from edible mushroom, pp. 459-466, 44th Kasetsart University Annual Conference: Science, Kasetsart University, Bangkok.
- [9] Attarat, J. and Phermthai, T. , 2015, Bioactive compounds in three edible *Lentinus* mushrooms, Walailak J. Sci. Tech. 12: 491-504.
- [10] Seephonkai, P., Samchai, S., Thongsom, A.,

- Sunaart, S., Kiemsanmuang, B. and Chakuton, K., 2011, DPPH radical scavenging activity and total phenolics of *Phellinus* mushroom extracts collected from Northeast of Thailand, Chin. J. Nat. Med. 9: 0441-0445.
- [11] Harbone, J.B., 1998, Phytochemical Methods: A Guide to Modern Technique of Plant Analysis, 3rd Ed., Chapman and Hall, New York.
- [12] Nagata, M. and Yamashita, I., 1992, Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and caro-tenoids in tomato fruit, Nippon ShokuhinKogyo Gakkaish 39: 925-928.
- [13] Srisukong, A., Jantree, K. and Hanpak phum, S., 2016, The study of antibacterial in weed extracts, VRU Res. Develop. J. Sci. Technol. 11: 69-82.
- [14] Fangkrathok, N., Sripanidkulchai, B., Umehara, K. and Noguchi, H., 2013, Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells, Nat. Prod. Res. 27: 1611-1619.
- [15] Sirival, N., 2010, The antioxidant in local edible mushrooms: Upper Northeastern Thailand, NU. Sci. J. 6: 165-172.
- [16] Imtiaj, A. and Tae-Soo., L. 2007, Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushroom, World J. Agric. Sci. 3: 316-321.