การสกัด และฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของเบต้ากลูแคนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Extraction and Anti-Microbial Properties of Betaglucan from *Cordyceps militalis*

วิชุดา กล้าเวช[1] ชนิดา กุประดิษฐ์[1] ปิยะมาศ จานนอก[2] หฤทัย โสตถิวนิชย์วงศ์[3] สุนิสา สีนาค[3]
E-mail: wichuda.kl@rmuti.ac.th, chanida.ku@rmuti.ac.th, piyamart.ja@rmuti.ac.th, kaewharuthai@gmail.com, sunisa76888@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดเบต้ากลูแคนจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำปราศจากไอออน เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน พบว่า การสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดเบต้ากลูแคนได้ 15.36 ± 0.37 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ ที่มีค่าเท่ากับ 12.49 ± 0.37 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Aspergillus niger* ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้น 50 มก./มล. และ100 มก./มล. ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ ส่วนสารสกัดเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 50 มก./มล. สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เพียงเชื้อเดียว ในขณะที่สารสกัดเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 100 มก./มล. สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเอทานอลจะได้ผลผลิตเบต้ากลูแคนมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ นอกจากนี้สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทานอลจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากน้ำ

คำสำคัญ: เบต้ากลูแคน ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดหยาบ

Abstract

The objective of this research was to studied beta-glucan from fruiting body of *Cordyceps militalis* extract. When the ethanol and deionized water were used as the extraction solvents. The result showed the beta-glucan content from fruiting body of *Cordyceps militalis* crude extract, it was found that the extract at 70% ethanol extraction was able to extract 15.36 ± 0.37 mg/ml of beta-glucan which is higher than the deionized water Extraction. The result exhibited 12.49 ± 0.37 mg/ml of beta-glucan. In addition, when the biological activity of crude extracts obtained were tested to against four pathogens such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*. The results of antibacterial and antifungal activity tests were found that the water extract at 50 and 100 mg/ml concentrations did not inhibit bacteria and fungi. Moreover, the crude extract with 50 mg/ml when extract with 70% ethanol, it was able to inhibit *S. aureus* infection only. While the ethanol extract at the concentration of 100 mg/ml was able to completely inhibit both bacteria and fungi. From the results of the study, it can be concluded that the extraction of fruiting body of *Cordyceps militalis* with ethanol showed a yield of beta-glucan more than the water extraction. Finally, the crude extract was extracted with ethanol is able to inhibit bacteria and fungi better than the crude extract from water.

Keywords: Beta-glucan, fruiting body of *Cordyceps militaris*, Bioactive compound, crude extract

ความเป็นมาของปัญหา

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps militaris*) เป็นราแมลง (Entomofungus) ในกลุ่มแอสโคมายซีส (Ascomycetes) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ (fungi Kingdom) เป็นเห็ดเมืองหนาวจัดอยู่ในกลุ่มของเห็ดที่เป็นยา (Medicinal mushroom) จะพบมากในทุ่งหญ้าบนภูเขาที่ระดับความสูง 10,000-12,000 ฟุต ในแถบประเทศจีน ทิเบต เทือกเขาหิมาลัย เนปาล และภูฏาน เป็นเห็ดที่ทุกคนทั่วโลกนิยมรับประทานกันมาก เนื่องจากในเห็ดถั่งเช่ามีคุณสมบัติที่ช่วยในการรักษาโรคต่างๆ และสามารถแยกสายพันธุ์ของเห็ดถั่งเช่า

[1] อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
[2] อาจารย์ประจำสาขาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรสภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และสถาปัตยกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
[3] นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

(*Ophiocordyceps sinensis*) เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Paecilomyces tenuipes* หรือ *Isaria japonica*) และเห็ดถั่งเช่าจั๊กจั่น (*P. scicadae* หรือ *I. sinclairii*) (ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา และคณะ, 2559) ซึ่งในประเทศไทยคนไทยจะนิยมรับประทานเห็ดถั่งเช่าสีทองมากเพราะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในประเทศไทยจึงทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองมีราคาค่อนข้างสูงถึงกิโลกรัมละ 8,000 - 15,000 บาท/กก. เห็ดอบแห้งราคากิโลกรัมละ 40,000 - 50,000 บาท ดอกสดในขวดเพาะเลี้ยง ราคาขวดละ 700 - 1,000 บาท (สุภาพร อวรัญ, 2562) ต่อมาได้มีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ เนื่องจากในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารประกอบที่ประกอบไปด้วยสารอาหาร วิตามิน เกลือแร่ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น คอร์ไดซิปิน (cordycepin) เบต้ากลูแคน (β-Glucans) และอะดีโนซิน (adenosine) ที่สูงกว่าเห็ดถั่งเช่าแท้ (ปวีนา น้อยทัพ และคณะ, 2561) และมีสรรพคุณที่ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในร่างกายได้ ช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยฟื้นฟูการทำงานของไตและลดภาวะแทรกซ้อนจากโรคไตช่วยทำให้ไตกลับมาทำงานได้ดีขึ้น ลดระดับไข่ขาวในปัสสาวะ ลดความดันโลหิต ควบคุมระดับไขมันในเลือด ลดคอเลสเตอรอล บรรเทาอาการโรคหอบหืดและมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในระยะลุกลามไม่ให้แพร่กระจาย (มลธิรา ศรีถาวร และคณะ, 2562) และผลของการรับประทานเห็ดถั่งเช่ายัง มีผลข้างเคียงอยู่มากเช่น มีฤทธิ์เสริมกับยาปฏิชีวนะที่อาจให้ผลมากเกินไปเพราะเห็ดถั่งเช่าสีทอง จะมีฤทธิ์ช่วยลดระดับน้ำตาลในเส้นเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงเพราะอาจทำให้น้ำตาลลดมากเกินไปจนเป็นอันตรายได้ และผู้ที่กำลังจะเข้ารับการผ่าตัดไม่ควรรับประทานถั่งเช่าสีทองเพราะมีฤทธิ์ทำให้เลือดแข็งตัวช้าต้านการเกาะกลุ่มของเลือดจึงอาจทำให้เกิดอาการรุนแรงได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกหลายเรื่องที่รายงานการค้นพบเบต้ากลูแคน (β-Glucans) ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ด แต่ยังไม่มีรายงานที่การสกัดและการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งเบต้ากลูแคนที่ได้จากเห็ดนั้นมีประโยชน์และคุณสมบัติในการป้องกันโรคและป้องกันโรคภูมิแพ้ตัวเองได้ และมีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) มี 1,3-β-Glucan เป็นโครงสร้างหลักบริเวณแกนกลาง (backbone) และมีสายกิ่งที่แตกแขนงออกมา (branch) โดยสายกิ่งอาจเป็นชนิด 1,4-β-Glucan หรือ 1,6-11-Glucan (ภูเบศร์ นิลาทะวงศ์, 2560)

ในปัจจุบันได้มีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทอง มาทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด เนื่องจากในเห็ดถั่งเช่าสีทองอุดมไปด้วยเบต้ากลูแคน (β-Glucans) แร่ธาตุและสารอาหารต่างๆ ปัจจุบันเห็ดถั่งเช่าสีทองเริ่มเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นเห็ดที่มีสารอาหารที่ครบถ้วน และมีสารคอร์ไดเซปินที่จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาที่มีเฉพาะในเห็ดตระกูลถั่งเช่า จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ยังไม่มีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาศึกษาหาปริมาณเบต้ากลูแคน แต่มีบางรายงานที่มีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแล้วบางชนิด ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงสนใจวิธีการสกัดเบต้ากลูแคนจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบแล้วนำสารที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเบต้ากลูแคนด้วยชุด Mushroom and Yeast Beta - Glucan Assay Kit และทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดเห็ดถั่งเช่าโดยทำการทดสอบกับเชื้อ 4 ชนิด คือ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *A. niger*

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราจากสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ประเภทของการวิจัย
   การวิจัยประเภททดลอง
2. ตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
   ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่า และฐานเห็ดถั่งเช่าแบบผงบดละเอียดได้รับความอนุเคราะห์จากร้านดีไลฟ์ ต.บ้านใหม่ อ.เมือง จ.นครราชสีมา แล้วนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาใช้การสกัดเบต้ากลูแคน
3. การศึกษาวิธีการสกัดเบต้ากลูแคนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
   3.1 การสกัดด้วยน้ำ
   นำเห็ดถั่งเช่าที่อบแห้งมาบดละเอียดด้วยโกร่งบด ปริมาณ 2 กรัม เติมน้ำ 20 มล. สกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเซลเซียส ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ไอน้ำร้อนแรงดันสูง 121 องศาเซลเซียส 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง NO.1 นำมาระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ปรับความเข้มข้นด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 100 มก/

มล. สารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน (มลธิรา ศรีถาวรและคณะ, 2562)

3.2 การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองที่อบแห้งมาบดละเอียดด้วยโกร่งบด ปริมาณ 2 กรัม เติมเอทานอล 70% 20 มล. สกัดในอ่างควบคุมอุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษ กรอง NO.1 นำมาระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ละลายกลับด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเบต้ากลูแคน (มลธิรา ศรีถาวร และคณะ, 2562)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเบต้ากลูแคนจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.1 การวิเคราะห์เบต้ากลูแคนทั้งหมดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.1.1 การวิเคราะห์เบต้ากลูแคนทั้งหมดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.1.1.1 นำตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่า 100 มก. ใส่ใน culture tube ขนาด 20x125 มม.

4.1.1.2 เติม hydrochloric acid ความเข้มข้น 12 โมลาร์ ประมาณ 2 มล. ลงใน culture tube ที่มีตัวอย่างปิดฝาเขย่าด้วย vortex mixer นำหลอดแช่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เขย่าทุก 15 นาทีจนครบ 2 ชั่วโมง

4.1.1.3 เติมน้ำกลั่น 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer คลายฝาหลอดออกและวางหลอด culture tube ลงใน water bath ที่มีอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีหลังจากนั้นปิดฝาหลอดให้แน่นแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 6 มล.

4.1.1.4 ถ่ายสารทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 100 มล. หลังจากนั้นใช้ Sodium acetate buffer ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ pH 5.0 ปรับปริมาตรและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer

4.1.1.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4.1.2 การหาปริมาณ D-Glucose

4.1.2.1 นำสารที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง 0.1 มล. ใส่หลอดทดลองขนาด 16x100 มม. เติมเอนไซม์ (exo-1,3-β-glucanase 20μl + β-glucosidase 4μl) 0.1 มล.

4.1.2.2 นำไปต้มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม GOPOD 3 มล.

4.1.2.3 นำไปต้มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สมการที่ใช้ในคำนวณหาปริมาณเบต้ากลูแคนทั้งหมด

Total Glucan (%W/W) = $\Delta E \times F \times 100/0.1 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180$

= $\Delta E \times F/W \times 90$

ΔE = ค่าการดูดกลืนแสงของ test – ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

F = แฟคเตอร์เปลี่ยนจากค่าการดูดกลืนแสงเป็นหน่วย μg ของ D-glucose

= 100 (μg ของ D-glucose standard) ค่าการดูดกลืนแสงของ GOPOD สำหรับ 100 μg ของ D-Glucose standard

100/0.1 = volume correction factor สำหรับ ปริมาณ total glucan

1/1000 = เปลี่ยนหน่วยจาก μg เป็น มก.

100/W = เปลี่ยนหน่วยกลับเป็น 100 มก. ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

162/180 = การเปลี่ยนสูตรการคำนวณ จาก free D-Glucose เป็น anhydroglucose หรือ Beta–Glucan

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Alpha-Glucan

สกัดสารเห็ดถั่งเช่าสีทอง 100 มก. ใส่ใน culture tube ขนาด 20x125 มม.

1) ใส่ magnetic stirrer bar ขนาด 5x15 มม. ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลายKOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ในที่เย็นประมาณ 20 นาที

2) เติม Sodium acetate buffer ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์, pH 3.8 ปริมาตร 8 มล. ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นเติม Amyloglucosidase (1630 μl) + invertase (500 μl) ปริมาตร 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำหลอดทดลองไปวางไว้ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าเป็นระยะ)

3) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4) นำสารที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16x100 มม. แล้วเติม buffer (pH 5) 0.1 มล. เติม GOPOD 3.0 มล.

5) นำไปต้มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

สมการที่ใช้ในคำนวณหาปริมาณ Alpha-Glucan

Alpha-glucan (%W/W) = ΔE×F×1000 หรือ 103×1/1000×100/W×162/180

= ΔE×F/W×9.27 (สำหรับปรัมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10.3 มล.)

ΔE = ค่าการดูดกลืนแสงของ test – ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

F = แฟคเตอร์เปลี่ยนจากค่าการดูดกลืนแสงเป็นหน่วย μg ของ D-glucose

= 100 (μg ของ D-Glucose standard) ค่าการดูดกลืนแสงของ GOPOD สำหรับ 100 μg ของ D-Glucose standard

103 = volume correction factor สำหรับแอลฟ่า-กลูแคน

1/1000 = เปลี่ยนหน่วยจาก μg เป็น มก.

100/W = เปลี่ยนหน่วยกลับเป็น 100 มก. ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

162/180 = การเปลี่ยนสูตรการคำนวณ จาก free D-glucse เป็น anhydroglucose หรือ Beta-Glucan

การคำนวณหาปริมาณ Beta-Glucan

ปริมาณสาร Beta-Glucan คำนวณได้จากสมการ

Beta-Glucan (%W/W) = Total glucan (%W/W) - Alpha-Glucan (%W/W)

5. เตรียมเชื้อที่ทำการทดสอบ

นำกล้าเชื้อ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร LB แล้วย้ายลงอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (นุศวดี พจนานุกิจ และคณะ, 2553) ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger* นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (วราภา มหากาญจนกุล และคณะ, 2559)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ทดสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี นำอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ) มาแบ่งช่องเป็น 6 ช่อง แล้วนำเชื้อ *E. coli*, *B. subtilis*, และ *S. aureus* ที่เลี้ยงไว้บนอาหารเหลว NB มา swab ลงบนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar (MHA) โดยทำ 3 ซ้ำ แล้วนำ paper disc จุ่มสารที่ต้องการทดสอบ (น้ำปราศจากไอออน เอทานอลเข้มข้น 70% ตัวอย่างสารสกัดหยาบในตัวทำละลายน้ำ และเอทานอล และยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Ampicillin) นำมาวางบนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar (MHA) ในแต่ละช่อง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วราภา มหากาญจนกุล และคณะ, 2559)

ทดสอบเชื้อรา *A. niger* ด้วยวิธี poisoned food technique โดยเตรียมอาหาร PDA ปริมาตร 20 มล. แล้วนำสารสกัดหยาบจากเห็ดถังเช่าผสมใส่ในอาหาร PDA เพลทละ 1 มล. หลังจากผิวหน้าของอาหารที่ผสมสารสกัดแห้งสนิท นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะเส้นใยรอบโคโลนีรา *A. niger* ที่มีอายุ7 วัน วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ผสมนำสารสกัดหยาบจากเห็ดถังเช่า บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกผล (ธารทิพย์ รัตนะ, 2559)

7. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย (Mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ผลการวิจัย

1. การศึกษาการสกัดเบต้ากลูแคนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

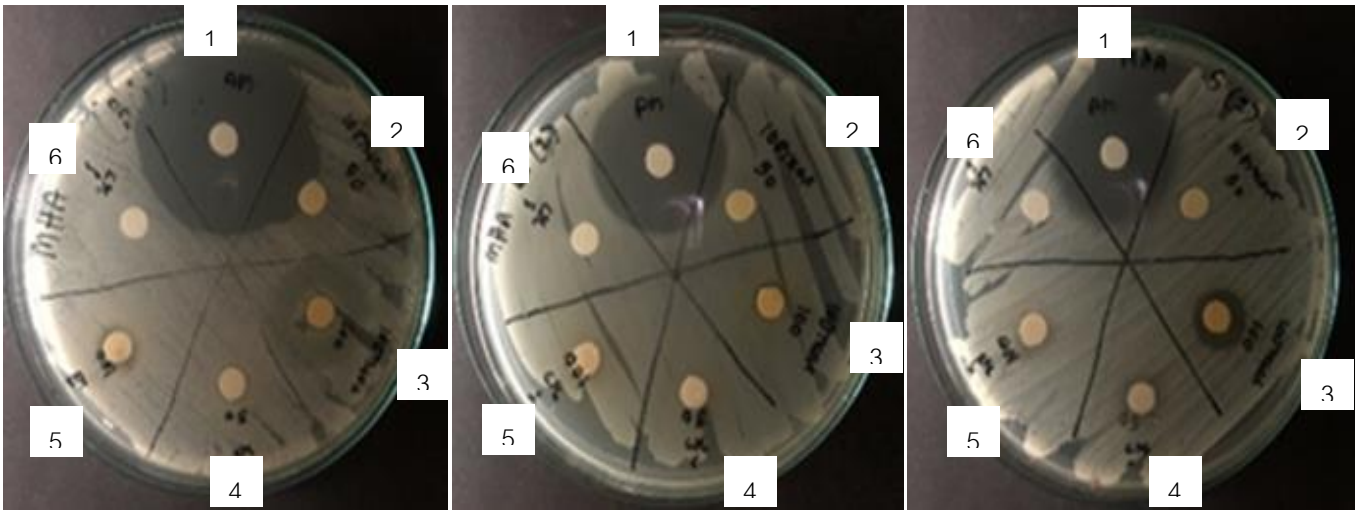
การศึกษาปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ดถังเช่าสีทองที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100 mg/ml โดยทำการวิเคราะห์กับชุดทดสอบ Mushroom and Yeast Beta-Glucan ค่าที่ได้จะปรากฏผลดังตารางที่ 1 ซึ่งจะพบว่าปริมาณเบต้ากลูแคนที่สกัดด้วยเอทานอลจะมีมากกว่าการสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน

ตารางที่ 1 ปริมาณเบต้ากลูแคนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่างสารสกัด	ปริมาณเบต้ากลูแคน (มก./มล.) ± S.D.
สารสกัดด้วยน้ำ	12.49 ± 0.37
สารสกัดด้วยเอทานอล	15.36 ± 0.37

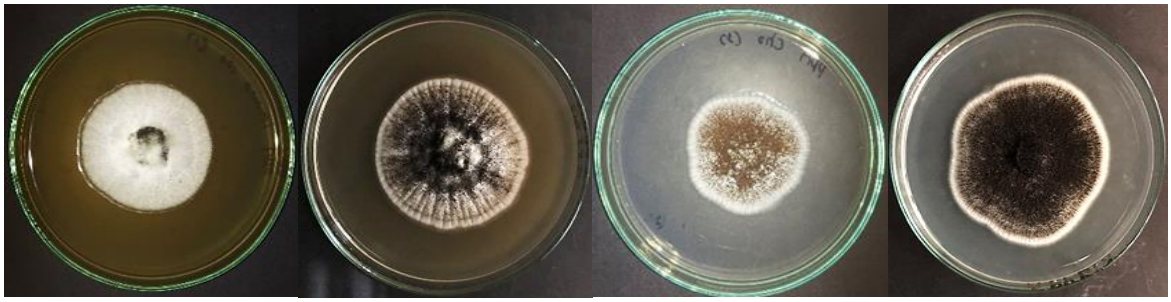
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis, S. aureus, E. coli* และเชื้อรา *A. niger* จากสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยผลของวงใส (Clear zone) ที่มีค่าเป็นบวกเป็นสารสกัดหยาบจากเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (หมายเลข 3) แสดงถึงการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากน้ำปราศจากไอออนไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค แสดงดังภาพประกอบที่ 1 – 3



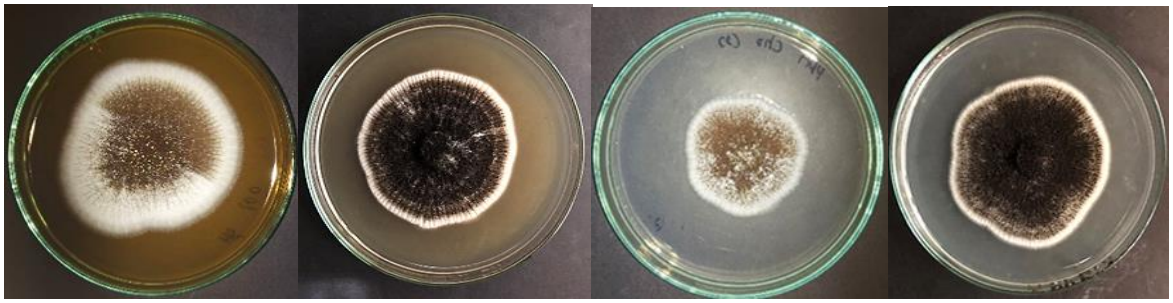
B. subtilis *E. coli* *S. aureus*

ภาพประกอบที่ 1 โซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis, S. aureus,* และ *E. coli* โดย 1: Amphicilin, 2: สารสกัดเอทานอลเข้มข้น 50 มก/มล., 3: สารสกัดเอทานอลเข้มข้น 100 มก/มล., 4: สารสกัดน้ำเข้มข้น 50 มก/มล., 5: สารสกัดน้ำเข้มข้น 100 มก/มล. และ 6: น้ำปราศจากไอออน (control)



เอทานอล 50 มก./มล. เอทานอล 100 มก./มล. Chloramphenicol Control

ภาพประกอบที่ 2 โซนการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* จากเห็ดถั่งเช่าที่สกัดด้วยเอทานอล



น้ำ 50 มก./มล. น้ำ 100 มก./มล. Chloramphenicol Control

ภาพประกอบที่ 3 โซนการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus niger* จากเห็ดถั่งเช่าที่สกัดด้วยน้ำ

อภิปรายผล

จากการศึกษาสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล และวิเคราะห์ด้วยชุด Mushroom and Yeast Beta-Glucan ที่อาศัยหลักการทำงานใช้เอนไซม์ไลเคนเนสในการไฮโดรไลซ์เบต้ากลูแคนให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ จากนั้นใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส เพื่อไฮโดรไลซ์ โอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นกลูโคส ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรด จะได้สารละลายที่มีสีชมพูที่เป็นตัวบ่งบอกปริมาณเบต้ากลูแคนในสารสกัด โดยนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ Total glucan และ Alpha-Glucan มาเข้าสูตรเพื่อคำนวณหาปริมาณเบต้ากลูแคน ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยของสุภารัตน์ จันทร์เหลือง และระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ (2558) ที่ศึกษาปริมาณเบต้ากลูแคนในเห็ดป่าที่มีการบริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี โดยศึกษาในเห็ด 22 ชนิด เมื่อนำปริมาณเบต้ากลูแคนของเห็ดถังเช่าสีทองมาเทียบกับปริมาณเบต้ากลูแคนกับเห็ดป่าที่ใช้บริโภค พบว่า เห็ดถังเช่าสีทองมีปริมาณเบต้ากลูแคนมากกว่า เห็ดมันปู (*Cantharellus cibarius* Fr.) เห็ดปลวกจิก (*Termitomyces clypeatus* Heim) เห็ดผึ้งนกยูง (*Boletellus emodensis* (Berk.) Sing.) เห็ดผึ้งคราม (*Boletus griseus* Frost.) เห็ดผึ้งเหลือง (*Boletus colossus* Heim.) เห็ดไส้เดือน (*Amanita vaginata* var. vaginata (Bull. & Fr.) Vitt.) เห็ดปลวกหยวก (*Termitomyces globules* Heim&Goossens) เห็ดปลวกไก่น้อย (*Termitomyces microcarpus* (Berk. & Br.)) ส่วนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* ด้วยวิธี Disc diffusion test พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มก./มล. ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ในขณะที่ Ampicillin ที่เป็น Positive control สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวัดขนาดวงใสได้ 3.50±0.10 ซม. สารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 50 มก./มล.สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เพียงเชื้อเดียว โดยให้ผลการยับยั้งเท่ากับขนาดวงใส 0.47±0.40 ซม. เมื่อเทียบกับ Positive control ที่ใช้เป็น Ampicillin ที่มีผลการยับยั้งเท่ากับขนาดวงใส 2.83±0.28 ซม. และ Negative control ที่เป็นน้ำกลั่น ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 มก./มล.สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* แต่สามารถยับยั้งได้ดีในเชื้อ *S. aureus* ที่มีผลการยับยั้งเท่ากับ 1.03±0.15 ซม. รองลงมา *E. coli* 0.92±0.26 ซม. และ *B. subtilis* 0.23±0.40 ซม. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ มลธิรา ศรีถาวร และคณะ (2562) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนดอกและส่วนเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่พบว่าสารสกัดเห็ดถั่งเช่าในส่วนดอกและส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* TISTR518 ได้ดีที่สุด และเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จากตัวทำละลายทั้งหมด นอกจากนั้นผลของการยับยั้งเชื้อราชนิด *Aspergillus niger* ของสารสกัดเบต้ากลูแคนจากเห็ดถั่งเช่าสีทองถือเป็นรายงานแรกที่พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งพบรายงานของ Bergendiova *et. al*. (2011) สารบีตากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatu*) เมื่อให้ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน ในอาสาสมัครที่เป็นนักกีฬาเพศชาย จำนวน 50 ราย ผลการทดสอบพบว่า อุบัติการณ์การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (upper respiratory tract infection) และอุบัติการณ์จากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของอาสาสมัครลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสามารถสกัดเบต้ากลูแคนได้ดีที่สุด โดยการสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังถือเป็นการรายงานข้อมูลการสกัดเบต้ากลูแคนจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นครั้งแรกอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อยอดทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้

ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการสกัดเบต้ากลูแคน และการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา, พีระศักดิ์ ฉายประสาท, และบุญส่ง แสงอ่อน. (2559). ผลของสูตรอาหารเทียมต่อการเกิดดอกและการผลิตสารสำคัญทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 3**(ฉบับพิเศษ): 34-46.

ธารทิพย์ รัตนะ. (2559). ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากสับปะรดและมะละกอในการต่อต้านราก่อโรคแอนแทรกโนสในพริก. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24**(3): 456-468.

ปวีนา น้อยทัพ, เพชรรุ้ง เสนานุช, และจตุรพร รักษ์งาร. (2561). การเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็งจากธัญพืชต่างชนิด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 49**. 3(พิเศษ): 112-117.

ภูเบศร์ นิลาทะวงศ์. (2560). **ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเบต้ากลูแคน (β-glucan) ในเห็ด**. หน่วยการศึกษาต่อเนื่อง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 1-10.

มลธิรา ศรีถาวร, พุทธวรรณ วาตะ, จิระดา พรมลา, และสาคร ชินวงค์. (2562). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วนดอกและส่วนเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทอง. **Veridian E-Journal. 6**(5): 33-47.

วราภา มหากาญจนกุล, พรรณรพี เอี่ยมทวีเจริญ, กิตติศักดิ์ อินทร์เสวก. (2559). ใน**การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54**: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาพันธุวิศวกรรม สาขาสถาปัตยกรรมศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 2559. หน้า 815-823.

สุภาพร อวรัญ. (2562). สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง. **วิชาการสถาบันการอาชีวศึกษาเกษตร. 3**(2): 15-23.

สุภารัตน์ จันทร์เหลือง และระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์. (2558). **การศึกษาหาปริมาณสารเบต้ากลูแคน โปรตีน และเส้นใยในเห็ดป่าที่ใช้บริโภคในจังหวัดอุบลราชธานี.** รายงานวิจัยโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรมจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 49 หน้า.

Bergendiova K, Tibenska E, Majtan J (2011). Pleuran (β-glucan from *Pleurotus ostreatus*) supplementation, cellular immune response and respiratory tract infections in athletes. **Eur J Appl Physiol 111**:2033-40.