รายงานการวิจัย

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเสม็ด

Mycelial cultivation on synthetic media and bioactive properties of *Boletus griseipurpureus*

อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ นางดลฤดี พิชัยรัตน์ และนพรัตน์ มะเห

คณะวิทยาศาสาตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ประจำปีงบประมาณ 2559 ซึ่งเป็นโครงการใหม่ในสาขาจุลชีววิทยาและการประยุกต์ โดยนำเห็ดเสม็ดซึ่งเป็นทรัพยากรในธรรมชาติที่มีอยู่ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง มาศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดเชนิดนี้บนอาหารสังเคราะห์ และคุณสมบัติทางทางชีวภาพเบื้องต้น ซึ่งเป็นการต่อยอดจากการศึกษาในระดับปริญญาเอก ทำให้ทราบโอกาสการพัฒนาเป็นเส้นใยของเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์และคุณสมบัติเบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในแนวทางสุขภาพจากทรัพยากรธรรมชาติในมหาวิทยาลัยในอนาคต ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยมา ณ โอกาสนี้

อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ

กันยายน 2560

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเสม็ด

อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ[1] ดลฤดี พิชัยรัตน์[1] และ นพรัตน์ มะเห[1]

บทคัดย่อ

เห็ดเสม็ดเป็นเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่กินได้เป็นที่นิยมในภาคใต้ของประเทศไทย วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อค้นหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดเสม็ด คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมในการต้านแบคทีเรีย จากการทดสอบอาหาร 4 ได้แก่ Potato dextrose agar หรือ PDA, Boletus medium, Modified Melin Norkran medium หรือ MMN, MMN ที่มีการเติมสารสกัดด้วยน้ำของเห็ดเสม็ดสด พบว่าน้ำหนักเส้นใยเห็ดเสม็ดนั้นเพิ่มขึ้นมากที่สุดบนอาหาร MMN ที่มีการเติมสารสกัดด้วยน้ำของเห็ดเสม็ดสด 10 % สำหรับสารสกัดหยาบเมทานอลจากเห็ดเสม็ดแห้งให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 200.3$\pm$4.4 µg vitamin C / กรัมต่อตัวอย่าง ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทจากเห็ดเสม็ดแห้งเท่ากับ 77.9$\pm$0.4 µg vitamin C / กรัมต่อตัวอย่าง ส่วนการตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีรีดิวซ์เฟอร์ริคให้ผลที่คล้ายคลึงกัน ขณะที่ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียด้วยวิธีการ agar well diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของเอทิลอะซีเตทจากเห็ดเสม็ดแห้งสามารถให้วงใสของการยับยั้งเชื้อ *P. aerunginosa* TISTR 2370 เท่ากับ 17.33$\pm$1.155 มม. และให้วงใสของการยับยั้งเชื้อ and *E. faecalis* TISTR 379 เท่ากับ13.33$\pm$2.082 มม.ซึ่งแตกต่างกับสารสกัดหยาบเมทานอลิกของเห็ดเสม็ดแห้งให้วงใสการยับยั้งเพียงเชื้อ *P. aerunginosa* TISTR 2370 เท่ากับ 15.33$\pm$0.577 มม.

คำสำคัญ เห็ดเสม็ด การสร้างเส้นใยของเชื้อรา สารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

Mycelial cultivation on synthetic media and bioactive properties of

Boletus griseipurpureus

Amornrat Angajchairya[1] Donrudee Pichairat[1] and Nopparat Mahae[1]

Abstract

Boletus griseipurpureus Corner is a popular edible ectomycorrhizal mushroom in the south of Thailand. The objective of this study was to identify optimal media for mycelial formation, antioxidant and antimicrobial activities. Of the four media tested, PDA, Boletus medium, MMN, and MMN with 10 % fresh basidiocarp hot water extract, the latter medium was superior for mycelial dry weight increment. Methanolic extraction of dried basidiocarps showed that the DPPH radical scavenging activity (200.3±4.4 µg vitamin C/g sample) was stronger than crude ethyl acetate extract (77.9±0.4 µg vitamin C/g sample). Ferric reducing antioxidant power (FRAP) gave similar results. While antibacterial properties of *B. griseipupureus* were examined by agar well diffusion The crude ethyl acetate extract from dried *B. griseipurpureus* revealed inhibition zones against *P. aerunginosa* TISTR 2370 (17.33±1.155 mm) and *E. faecalis* TISTR 379 (13.33±2.082 mm). By contrast, the crude methanolic extract only inhibited *P. aerunginosa* TISTR 2370 (15.33±0.577).

Key words: *Boletus griseipurpureus*, mycelial formation, antioxidation and antibacterial activity

.....

[1]Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์	12
1.4 วัสดุและอุปกรณ์	12
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	13
2.1 วัสดุและอุปกรณ์	13
2.2 วิธีการทดลอง	14
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	17
3.1 การเพาะเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์	17
3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดแห้ง	20
3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดแห้ง	22
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	18
2	การทดสอบการต้านอนุมลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในตัวทำละลาย 2 ชนิด	20
3	วงใสจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิดด้วยสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในตัวทำละลาย 2 ชนิด	22

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ไดอะแกรมภาพตัดตามขวางของรากพืชที่มีเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซ่า	4
2	ไดอะแกรมภาพอาบัสคูล่าไมคอรไรซ่า	5
3	เห็ดเสม็ด	7
4	เห็ดเสม็ด เส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์ MMN ที่เติมน้ำสกัดเห็ดเสม็ดสด 10%	19

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

การใช้ประโยชน์จากเห็ดป่ากินได้ในชุมชนท้องถิ่นได้สืบต่อกันมากจากรุ่นสู่รุ่น และเห็ดป่ากินได้ มีคุณสมบัติในการรักษาโรคหลายชนิดซึ่งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ตกทอดมาจากอดีตจนถึงปัจจุบัน พบได้ในหลายประเทศได้แก่ประเทศมาเลเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ อินเดีย อินโดนีเซีย (Lee and Chang, 2004, Cai, 2010, Tibuwa, 2013, Lau 2014 and Venkatachalapathi and Paulsamy, 2016). เห็ดเป็นอาหารที่มีประโยชน์ในด้านสุขภาพเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการ เห็ดหลายชนิดก็มีสรรพคุณทางยา (ชลดา และคณะ, 2556) เห็ดบางชนิดมีราคาสูงเพราะนอกจากมีคุณค่าทางโภชนาการและมีคุณค่าทางยาเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น มีสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านการอับเสบ สารต้านแบคทีเรียเป็นต้น (Kosanic *et al*., 2012, and Hamza *et al*., 2016). ในประเทศไทย ประชาชนในภาคอีสานมีการบริโภคเห็ดหลายชนิด ได้แก่เห็ดในจำพวกเห็ดผึ้งซึ่งชาวบ้านนิยมบริโภคได้แก่ ได้แก่ เห็ดในตระกูล Austroboletus, Boletellus, Boletus, Chalciporus, Heimiella, Hydnum, Leccinum, Phaeogyroporus, Phylloporus, Strobilomyces, Suillus, Tylopilus, Xerocomus (อุษา ละวินัย, มมป) เห็ดหลายชนิดก็มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น เห็ดหิ้งเกือกม้า (*Phellinus rimosus*) มีฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์ และเห็ดในตระกูล Bolete เช่น *Boletus edulis* มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง (Zhang *et al*., 2011) เห็ดกลุ่มนี้พบได้ในทางตอนใต้ของประเทศไทยด้วย เช่น เห็ดเสม็ด ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Boletus griseipurpureus* Corner มีรายงานการศึกษาสารสกัดจากเห็ดเสม็ดมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียบางชนิด (Angajchariya, 2013)

สำหรับภาคใต้ของประเทศไทยเห็ดเสม็ดเป็นเห็ดพื้นบ้านชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคของคนในท้องถิ่น ดั้งนั้นเห็ดเสม็ดจึงมีราคาสูงเนื่องจากพบได้เฉพาะฤดูกาลเท่านั้น สภาพที่เหมาะแก่การงอกของเห็ดชนิดนี้ คือ สภาพอากาศที่ร้อน แห้ง หลังจากนั้นมีฝนตก 1-2 ครั้งก็ทำให้เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการงอกของเห็ดชนิดนี้ (สายพิณ 2541) ปัจจุบันเห็ดเสม็ดมีปริมาณลดลงมาก เนื่องจากมีการเก็บเห็ดเสม็ดจำนวนมาก อีกทั้งชาวบ้านจะเก็บเห็ดที่มีขนาดใหญ่และเล็กโดยไม่คำนึงปริมาณเชื้อเห็ดเสม็ดในธรรมชาติ รวมถึงการบุกรุกพื้นที่ป่าเสม็ดขาวมากขึ้น รวมถึงฤดูกาลเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากอุณหภูมิโลกสูงขึ้น ทีมผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาการเพาะเส้นใยเห็ดเสม็ดเพื่อพัฒนาหัวเชื้อเพื่อจะนำไปสู่การอนุรักษ์เห็ดเสม็ดให้อยู่ร่วมกับพืชอิงอาศัยโดยให้เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่อยู่คู่กับท้องถิ่นและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเป็นทางเลือกในการผลิตสารยับยั้งหรือต้านเชื้อจุลชีพในอนาคต

1.2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การบริโภคเห็ดในประเทศไทยนั้นเป็นทีนิยมอย่างแพร่หลาย ทั้งเห็ดเศรษฐกิจและเห็ดพื้นบ้าน เห็ดเป็นอาหารที่มีประโยชน์ในด้านสุขภาพเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูง แต่ไขมันต่ำ เห็ดหลาย

ชนิดก็มีสรรพคุณทางยาเพราะมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย อาทิเช่น การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) การต้านมะเร็ง (anticancer) ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) การต้านแบคทีเรีย (antimicrobial) ส่งเสริมการทำงานของตับ (hepatoprotective) และคุณสมบัติการต้านโรคเบาหวาน (antidiabetic properties) (Cheung, 2010; Zhang *et al*., 2016) เห็ดกินได้บางชนิดมีคุณสมบัติการเป็นเอกโตไมคอร์ไรซ่า (ectomycorrhiza fungus) ซึ่งเป็นราที่อยู่ร่วมกับรากพืชอิงอาศัย เห็ดหลายชนิดมีราคาค่อนข้างสูงได้แก่เห็ด truffle ในยุโรปมีราคากิโลกรัมละ 30,000 บาท (Hall *et al*., 2003) ในประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนและมีความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดค่อนข้างสูง เห็ดเป็นอาหารจากชุมชนที่มีราคาต้องแต่สูงจนถึงต่ำ เห็ดกินได้จากป่าเหล่านี้ทำให้คนในท้องถิ่นสามารถสร้างรายได้จากการเก็บเห็ดป่ากินได้ไปจำหน่ายตั้งแต่ราคาต่ำไปจนถึงราคาสูง ตัวอย่างเช่น เห็ดป่ากินได้ที่พบในทางภาคเหนือของประเทศไทย เห็ดป่ากินได้ที่มีราคาสูงประมาณ 200 บาท/กิโลกรัมขึ้นไป ได้แก่ เห็ดไคร้ (*Boletus colossus*) เห็ดเผาะ (*Astraeus hygrometricus*) เห็ดที่มีราคาปานกลาง 100-200 บาท ได้แก่กลุ่มเห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) เห็ดโม่งโก้งขาว (*Amanita princeps*) เห็ดหอมดิน (*Agaricus campestris*) เห็ดกูด (*Cortinarius sp.*) เห็ดตีนตุ๊กแก (*Schizophyllum commune*) และ เห็ดลม (*Lentinus polychrous*) ส่วนเห็ดที่มีราคาต่ำกว่า 100 บาท ได้แก่ เห็ดหูหนูป่า (*Auricularia sp.*) เห็ดมันกบ (*Polyporus luberaster*) (พรรณพร และปิยะนุช 2554) ในทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีป่าไม้ผลัดใบทำให้มีความหลากหลายของเห็ดหลายชนิดเช่นกันรวมถึงเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่กินได้ ตัวอย่างเช่น มีการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในป่าชุมชนโคกใหญ่ในจังหวัดมหาสารคาม พบเห็ดแทคเห็ดทา (*Calvatia boninensis*) เห็ดตะป้อ (*Calvatia craniiformis*) เห็ดที่เกิดกับตอไม้ (*Lentinus polychrous* Lev.) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) เห็ดหูหนู (*Auricularia auricular* Judae) เห็ดที่เกิดใต้ดิน เห็ดเผาะ (*Astreaus hygrometricus* Pers, Morgan) เห็ดที่เกิดบริเวณจอมปลวก เห็ดปลวกขาว (*Calvatia boninensis*) เห็ดปลวกจิก (*Termitomyces microcarpus*) เห็ดที่เกิดบนพื้นดินใต้ต้นไม้ (*Amanita hemibapha*) เห็ดไค (*Russula delica*) เห็ดผึ้ง (*Heimiella retispora* Pat and Bak.) (สมสงวน และคณะ 2557)

เห็ดป่ากินได้หลายชนิดเป็นเห็ดที่อยู่ร่วมกับพืชอิงอาศัยเรียกว่า เอกโตไมคอร์ไรซ่า (Ectomycorrhizal fungus) เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่รับประทานได้ส่วนใหญ่มีราคาสูงเพราะพบได้เฉพาะฤดูกาลเท่านั้น ในต่างประเทศมีข้อมูลการเก็บเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่กินได้ มีมูลค่าเข้าประเทศปีละหลายล้านบาท ตัวอย่างเช่น *Tricholoma matsutake* ให้มูลค่าปีละ500 ล้านดอลล่าห์สหรัฐ *Boletus edulis* ให้มูลค่า 250 ล้านดอลล่าห์สหรัฐ เห็ดทรัพเฟิล (truffe) หรือ *Tuber melanosporum* สร้างมูลค่าปีละมากกว่า 150 ล้านดอลล่าห์สหรัฐ (Roy, 2003) เนื่องจากเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่า เป็นไมคอร์ไรซ่าชนิดหนึ่งมีลักษณะแตกต่างจากเห็ดราทั่วไป เห็ดพวกนี้มีความสัมพันธ์กับพืชอิงอาศัยแบบพึ่งพากัน

ราชนิดไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) เป็นการอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพากัน (mutualism) ระหว่างเชื้อรา (fungi) และรากพืช โดยที่พืชได้รับน้ำและธาตุอาหาร เช่น ฟอสฟอรัสและไนโตรเจนจากเชื้อรา ในขณะ

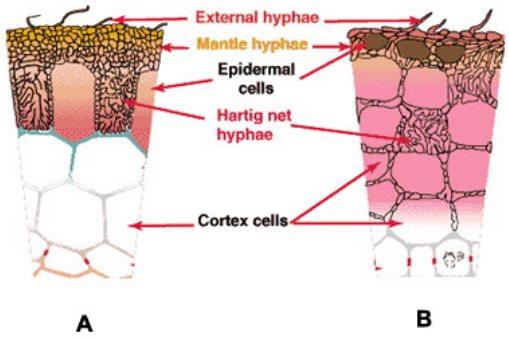
ที่เชื้อราได้รับสารอาหารที่จำเป็น เช่น น้ำตาล กรดอะมิโนและวิตามินจากพืชผ่านทางระบบราก รากฝอยทำหน้าที่หาอาหารให้กับพืช (fine feeder root) เป็นที่อยู่ของเชื้อราที่อยู่ร่วมกับเนื้อเยื่อพืชแบบอิงอาศัย โดยเส้นใยราหรือไฮฟา (hypha) ที่เจริญอยู่ภายนอกรากและภายในรากจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมธาตุอาหารให้แก่พืช จึงทำให้พืชที่มีเส้นใยราไมคอร์ไรซา (mycorrhizal fungi) อาศัยอยู่ที่รากมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าพืชที่ไม่มีเชื้อราไมคอร์ไรซาอาศัย นอกจากนี้ราไมคอร์ไรซายังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช จากการศึกษาพบว่า รากของพืชเกือบทุกชนิดมีไมคอร์ไรซาอาศัยอยู่ และมีส่วนช่วยให้พืชรอดชีวิตเมื่อเจริญบนดินที่มีสภาพไม่เหมาะสมได้ เช่น ดินที่มีความเป็นกรดสูง ดินเค็มและดินที่ขาดธาตุอาหาร สภาวะที่ค่อนข้างแห้งแล้ง เป็นต้น (Brundrette *et al*, 1998)

ชนิดของไมคอร์ไรซา

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของไมคอร์ไรซ่า สามารถจำแนกไมคอร์ไรซาได้เป็น 2 กลุ่ม ที่มีความสำคัญและมีการแพร่กระจายมากคือ เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) และอาบัสคูลาไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhiza) หรือเอนโดไมคอร์ไรซา (endomycorrhiza)โดยทั้งสองมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ คือ เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดธาตุอาหารของราก ช่วยให้ลำต้นพืชเหี่ยวช้าในสภาวะขาดน้ำ และที่สำคัญราไมคอร์ไรซ่ามีหลายชนิดที่พบในเขตร้อนสามารถนำมาบริโภคได้ ทั่วโลกพบเห็ดราไมคอร์ไรซาประมาณ 3,000-5,000 ชนิด

เอคโตไมคอร์ไรซา

เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและรากพืช โดยเส้นใยของเอกโตไมคอร์ไรซ่าจะเจริญรอบๆ ราก และสานตัวเป็นแผ่นหรือเป็นปลอกหุ้มเรียกว่าแมนเทิล (mantle) ซึ่งจะมีสีและความหนาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของราเอกโตไมคอร์ไรซ่า เส้นใยบางส่วนจากแมนเทิลจะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส (epiderimis) และชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ของรากพืช แล้วเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบๆ เซลล์เรียกว่าฮาทิกเนท (Hartig net) (รูปที่ 1) ราเอคโตไมคอร์ไรซามีมากกว่า 5,000 ชนิดและอยู่ร่วมกับรากของพืชใบเลี้ยงคู่ที่เป็นไม้พุ่มและไม้ต้นประมาณ 8,000 ชนิด เช่นพืชในวงศ์สน (Pinaceae) และวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) เป็นต้น แต่ไม่พบเอคโตไมคอร์ไรซาอยู่ร่วมกับรากของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว



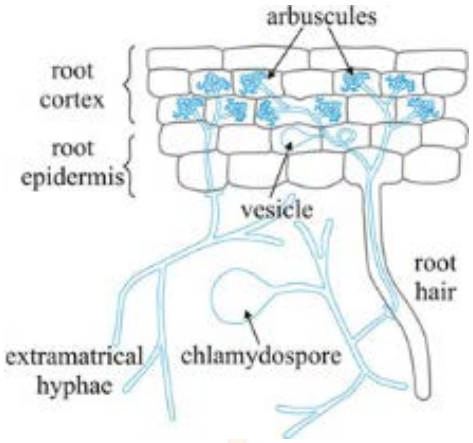
รูปที่ 1 A ไดอะแกรมภาพตัดตามขวางของรากพืชที่มีเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซ่า

B ไดอะแกรมภาพตัดตามขวางของรากพืชที่มีเชื้อราอาบัสคูร่าไมคอร์ไรซ่า

เอคโตไมคอร์ไรซาส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Phylum Basidiomycota) และบาง ส่วนอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (Phylum Ascomycota) และไฟลัมไซโกไมโคตา (Phylum Zygomycota) เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ราเอคโตไมคอร์ไรซาจะสร้างดอกเห็ดทั้งที่อยู่บนดินและบางชนิดสร้างดอกเห็ดใต้ดิน เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่สร้างดอกเห็ดบนดิน ได้แก่ เห็ดลูกฝุ่น (Rhizopogon) และเห็ดน้ำนม (Lactarius) เป็นต้น บางชนิดนิยมนำมารับประทาน เช่น เห็ดระโงกเหลือง *(Amanita hemibapha)* และเห็ดน้ำหมาก (Russula) เป็นต้น ส่วนเอคโรไมคอร์ไรซ่าที่สร้างดอกเห็ดใต้ดิน เช่น เห็ดเผาะ (Astraeus) และเห็ดทรัฟเฟิล (truffle) ซึ่งเป็นเห็ดที่นิยมรับประทานมากในประเทศเขตหนาว มีราคาแพงเนื่องจากมีรสชาติอร่อยและไม่สามารถเพาะได้ต้องเก็บจากป่า เอคโตไมคอร์ไรซาทั่วโลกพบ 167 ชนิด มีรายงานพบในระบบนิเวศป่าไม้ในประเทศไทย ได้สำรวจของไทยแล้ว 47 ชนิด โดยพบชนิดของเห็ดราไมคอร์ไรซาที่มีศักยภาพ ได้แก่ เห็ดราในวงศ์ Russulaceae: เห็ดไคลหลังเขียว (*Russula aeruginea*) เห็ดน้ำแป้ง (*Russula albida*) เห็ดไคลหลังขาว (*Russula delica*) เห็ดน้ำหมาก(*Russula lepida*) และเห็ดหาด (*Lactarius hygrophoroides*) วงศ์ Boletaceae : เห็ดน้ำผึ้ง (*Boletus edulis*) วงศ์ Cortinariaceae : เห็ดขี้เถา (*Cortinarius alboviolaceus*) และวงศ์ Sclerodermataceae: เห็ดเผาะ (*Astraeus hygrometricus*) (กิตติมา มปป)

อาบัสคูลาไมคอร์ไรซา

เป็นความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อราและเนื้อเยื่อของรากพืช โดยเส้นใยราเจริญเข้าไปในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ ของราก และสร้างโครงสร้างของราเรียก อาบัสคูล (arbuscule) เส้นใยราทำหน้าที่สะสมธาตุอาหาร และส่งธาตุอาหารไปให้กับพืช บางครั้งเชื้อราอาบัสคูลาไมคอร์ไรซ่าจะสร้างโครงสร้างชนิดหนึ่งเรียกว่า เวสิเคิล (vesicle) ที่บริเวณปลายหรือกลางเส้นใย มีลักษณะรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ผนังหนา ภายในเวสิเคิลมีหยดไขมันสีเหลือง ใช้สำหรับเก็บสะสมสารอาหารของรา (รูปที่ 2) นอกจากนี้ยังพบสปอร์ที่สร้างจากเส้นใยภายนอกรากซึ่งสปอร์ทำหน้าที่สำหรับแพร่พันธุ์(สุนัดดา มปป)



รูปที่ 2 ไดอะแกรมอาบัสคูร่าไมคอร์ไรซ่า

เห็ดเสม็ด

เห็ดเสม็ด (*Boletus griseipurpureus* Corner) หรือคนใต้เรียกว่า “เห็ดเหม็ด” เป็นเห็ดตับเต่าชนิดหนึ่งที่มีถิ่นกำเนิดในภาคใต้ รวมทั้งในจังหวัดตรัง (Aung-aud-chariya และ คณะ, 2012) เห็ดชนิดนี้พบได้ในภาคตะวันออกของประเทศไทย (Seehanan และ Petcharat, 2008) และสามารถพบเห็ดชนิดเดียวกันนี้ได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีชื่อพื้นเมือง เห็ดผึ้งยูคา ได้มีการจัดจำแนกอยู่ในอีกจีนัสหนึ่งของกลุ่มเห็ด Bolete ซึ่งให้ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tylopilus plumbeoviolaceus* (Snell and Dick, 1941) เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการจัดจำแนกเห็ดเสม็ดโดยใช้เทคนิคอนูพันธุศาสตร์(molecular identification) สำหรับยีน 2 ชนิด โดยมีการเก็บตัวอย่างในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ตัวอย่างของเห็ดเสม็ดที่ได้จากป่าเสม็ดในจังหวัดตรัง เห็ดชนิดเดียวกันจากป่ากระถินเทพาในจังหวัดนครศรีธรรมราชและจากป่ากระถินเทพาในจังหวัดสงขลา จากการศึกษา ยีน Internal transcripe sequence (ITS) พบว่าสามารถจัดกลุ่มของเห็ดชนิดนี้ให้อยู่ใน genus Tylopilus ซึ่งมีความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการมากกว่า genus Boletus (Aung-aud-chariya *et al*, 2012) ในขณะที่ผลการศึกษาการจัดจำแนกของเห็ดชนิดนี้จากป่ากระถินเทพาในสองจังหวัดทางภาคใต้คือ สุราษฎร์ธานีและสงขลา เห็ดยูคาจากป่ายูคาลิปตัสในสองจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้ยีน RNA Polymerase II Second Largest Subunit (RPB2) ในการศึกษา พบว่าเห็ดเสม็ดจากป่ากระถินเทพาทางภาคใต้และเห็ดยูคาจากป่ายูคาลิปตัสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหลากหลายที่ต่ำและสามารถจัดจำแนกเห็ดชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม genus Boletus (Aung-aud-chariya *et al,* 2015)

สัณฐานวิทยาของเห็ดเสม็ด

ลักษณะหมวกดอกเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-15 ซม. มีลักษณะรูปร่างโค้งนูนครึ่งทรงกลมแล้วเมื่อดอกเห็ดแก่พัฒนาเป็นรูปร่างนูนแกมระนาบ ผิวหมวกเห็ดแห้ง มีสีม่วงถึงสีม่วงเข้ม ม่วงเทาและม่วงอ่อนในที่สุด เนื้อเห็ดสีขาวไม่เปลี่ยนสีเมื่อสัมผัสอากาศ มีรสขม ใต้หมวกดอกเห็ดมีรูเล็กๆ สีครีม แล้วเมื่อดอกเห็ดแก่สีของใต้หมวกดอกเห็ดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงอมชมพูหรือน้ำตาลอมม่วง รอบก้านดอกเป็นร่อง สีของสปอร์พ

ริ้นต์มีสีน้ำตาลอมชมพูขนาด 10-13 X 3-4 ไมครอน สปอร์ผิวเรียบ ก้านของดอกเห็ดยาว 8-12 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 ซม. ขนาดก้านดอกสม่ำเสมอหรือเรียวใหญ่ที่โคนก้านดอก ผิวเรียบ ด้านบนสีม่วงเข้มแต่โคนก้านดอกสี ด้านบนของก้านดอกที่ติดกับหมวกดอกมีลายคล้ายร่างแห (รูปที่ 3) ลักษณะการเกิดดอกเห็ด เกิดขึ้นเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มบนพื้นดินใต้ต้นไม้เนื้ออ่อนหรือต้นยูคาลิปตัส ในป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง (อุษา และ วินัย, 2550) ในขณะที่เห็ดเสม็ดที่พบอยู่ใกล้กับต้นเสม็ดขาวและต้นกระถินเทพาทางภาคใต้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจากเห็ดยูคาที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

รูปที่ 3 เห็ดเสม็ด

ทางภาคใต้ของประเทศไทย มีป่าเสม็ด (Melaleuca forest) เป็นสังคมพืชป่าพรุ (Peat Swamp Forest) เป็นพืชที่มีลักษณะเฉพาะตัว เกิดในพื้นที่ลุ่มต่ำ หรือสภาพเป็นแอ่งน้ำจืดท่วมขังติดต่อกันเป็นเวลานาน เนื่องจากมีพืชพรรณ และสัตว์ชนิดต่างๆ อยู่จำนวนมาก จึงเป็นแหล่งที่มีคุณค่าทางด้านนิเวศวิทยาอย่างมหาศาล เพราะประกอบด้วยซากพืช และอินทรียวัตถุทับถมรวมอยู่บนผิวดิน หนาตั้งแต่ 0.5-5 เมตร หรือมากกว่า และมีค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-6 ซึ่งในป่าเสม็ดจะมีต้นเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron*) จำนวนมาก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเห็ดเสม็ดงอก เห็ดเสม็ดจัดเป็นราชนิดเอกโตไมคอร์ไรซ่าชนิดหนึ่ง ซึ่งนอกจากต้นเสม็ดขาวแล้วยังพบพืชอิงอาศัยชนิดอื่นที่เป็นพืชเจ้าบ้านให้เห็ดเสม็ดได้อีกคือ ต้นกระถินเทพา (*Acacia mangium*) ต้นกระถินณรงค์ (*Acacia auriculiformis* Cunn) ต้นสนทะเล (*Casuarina equisetifolia*) ตัวอย่างเช่นในฤดูกาลการงอกของเห็ดเสม็ดในพื้นที่ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังนั้นจะมีชาวบ้านจำนวนมากจากหลายพื้นที่ในจังหวัดตรังมาเก็บเห็ดเสม็ดในพื้นที่ของ

มหาวิทยาลัยเพราะในพื้นที่เหล่านี้มีป่าเสม็ดจำนวนมากซึ่งเป็นพืชอิงอาศัยของเห็ดเสม็ด (ปิยะวัฒน์ และโกสินทร์ 2552; ลัดดาวัลย์ และคณะ 2560) ซึ่งในการงอกของเห็ดเสม็ดยังมีปัจจัยทางกายภาพที่เกี่ยวข้องและส่งเสริมการงอกของเห็ดเสม็ด

ลักษณะปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลให้เกิดการงอกของเห็ดชนิดนี้ยังมีรายงานไม่มาก บางรายงานบ่งบอกว่า พบเห็ดชนิดนี้ในบริเวณที่ชื้น อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 92% มีค่าพีเอช 7 ความเข้มแสง 1,862 Lux หลังฝนตกหนัก 2-3 วัน และอากาศร้อนอบอ้าว พบตลอดในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน (พิมพ์เพ็ญ มปป) สอดคล้องกับ สมสงวน และคณะ 2557 ได้รายงานเกี่ยวกับการเก็บเห็ดป่ากินได้ในชุมชนโคกใหญ่จะเกิดขึ้นในสภาพอากาศร้อนอบอ้าวมากหลังฝนตก 3-4 วัน ขณะที่มีการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการงอกของเห็ดเสม็ดใน 3 พื้นที่ของจังหวดตรังได้แก่ 2 พื้นที่ในตำบลไม้ฝาด และ หนึ่งพื้นที่ในตำบลบ่อหิน โดยที่ตำบลไม้ฝาด พบป่าเสม็ดขาวในพื้นที่ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ซึ่งมีข้อมูลของการงอกของเห็ดเสม็ด โดยมีการนำตัวอย่างดินที่ขุดลึกลงไปจากผิวดิน 20 เซนติเมตรในบริเวณที่เห็ดเสม็ดเคยงอกไปวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในดินและปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช พบว่าปริมาณอินทรียวัตถุในดินและปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชเพิ่มขึ้นในช่วงเห็ดเสม็ดงอก ซึ่งเป็นผลจากการเกิดฝนตกเกิดการละลายสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในดิน ทำให้ต้นพืชนำสารเหล่านั้นไปใช้เจริญเติบโต รวมถึงเกิดการกระตุ้นระบบรากของพืชที่มีราเอคไมคอร์ไรซ่าอาศัยร่วมกับพืชเจ้าบ้าน เลยส่งผลให้มีการงอกของดอกเห็ดเสม็ดจำนวนมากในช่วงเดือนเมษายนจนถึงเดือนมิถุนายน (ลัดดาวัลย์ และคณะ 2560) แม้ว่าเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่กินได้หลายชนิดจะมีราคาแพง แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อจำกัดของเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าหลายชนิดยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้

เนื่องจากเอกโตไมคอร์ไรซ่ากินได้มีราคาค่อนข้างสูงและพบได้เฉพาะในฤดูกาลเท่านั้น ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้พยายามทดลองการเพาะเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าในห้องปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตในลักษณะเส้นใยบนอาหารสังเคราะห์ เช่น *Phlebopus portentosus* หรือเห็ดห้า *P. portentosus* เจริญได้บนอาหาร Gamborg (Sanmee *et al*., 2010) *Pisolithus tinctorius*เจริญได้บนอาหาร Modified Melin Norkrans หรือ MMN (Janyakumar และ Tan 2005), *Lactarius delciosus, Boletus aureus, Boletus reticulatus* เจริญได้บนอาหาร MMN (Xu *et al*., 2008), (Auega *et al*., 2008) เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซ่าบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วไปอย่าง Potato Dextros Agar (PDA) เช่น เห็ดเผาะสามารถพัฒนาเป็นเส้นใยบนอาหารสังเคราะห์ โดยนำส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มสปอร์ (peridium) และผงสปอร์ของดอกเห็ดเผาะในระยะแก่ สามารถแยกเชื้อได้จากส่วนต่างๆ ของดอกเห็ดบนอาหาร PDA แต่ส่วนของเยื่อหุ้มสปอร์สามารถเจริญงอกเป็นเส้นใยได้เร็วที่สุด โดยทั่วไปเส้นใยเจริญค่อนข้างช้าโดยมีโคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 9 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 30-45 วัน (จันจิรา และคณะ, มมป) อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากเห็ดป่ากินได้จำพวกเห็ดพื้นบ้านที่เป็นเอคโตไมคอร์ไรซ่าในประเทศไทยยังมีจำนวนไม่มาก ดังนั้นการศึกษาเห็ดเสม็ดจำเป็นต้องศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยและจำเป็นต้องศึกษาทางด้านการใช้ประโยชน์ควบคู่ไปด้วยซึ่งจะทำให้เห็ดชนิดนี้มีคุณค่า

กับมนุษย์เพิ่มสูงขึ้นในอนาคต เช่นคุณค่าของเห็ดชนิดนี้ในด้านสรรพคุณทางยาเบื้องต้น ได้แก่ การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลชีพ ซึ่งมีส่วนช่วยให้เห็ดชนิดนี้มีคุณสมบัติเด่นมากขึ้นและเอื้อประโยชน์ให้กับมนุษย์เพิ่มขึ้น

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ด

เห็ดเศรษฐกิจและเห็ดป่ากินได้พื้นบ้านหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา บางชนิดมีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคที่ร้ายแรงหรือโรคที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ และเห็ดอีกหลายชนิดช่วยในการป้องกันและรักษาโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) โรคเบาหวานชนิดที่สอง (diabetes mellitus type II) โรคทางระบบประสาท (neurodegenerative diseases) ทั้งนี้เพราะว่าเห็ดมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย หนึ่งในสารเหล่านั้นคือสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Zhang *et al*., 2016)

สารต้านอนุมูลอิสระคือ สารชนิดนี้เป็นสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายอนุมูลอิสระ (free radical) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถป้องกันเซลล์โดยการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากออกซิเจนหรือเปอร์ออกไซด์ สารอนุมูลอิสระเหล่านี้มีคุณสมบัติในการทำลายองค์ประกอบของร่างกายที่ประกอบด้วย สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่จำพวก โปรตีน ไขมัน หรือสารพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอ (Zhang *et al*., 2016) สารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตเพราะมีคุณสมบัติทำให้อนุมูลอิสระถูกปล่อยออกมาช้าลงหรือหยุดรูปแบบการเกิดอนุมูลอิสระ แม้ว่ามีกระบวนการในการป้องกันต่อต้านการทำลายปฏิกิริยาออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระตามธรรมชาติโดยสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย เช่น กลูต้าไทโอนที่สร้างจากเซลล์ แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระได้ทั้งหมด (ธารทิพย์ และธนากร 2559) จึ่งเป็นเหตุให้นักวิทยาศาสตร์ในปัจจุบันพยายามหาสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น สมุนไพร ธัญพืช ผลไม้ ผัก และเห็ดที่เป็นอาหารของมนุษย์ จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาเห็ดหลายชนิด รวมถึงเห็ดที่พบในท้องถิ่นเพื่อใช้ในการประยุกต์รักษาโรคต่างๆ มากขึ้น เพราะเห็ดจะมีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในตัวดอกเห็ด มีการศึกษาโดยใช้สารสกัดหยาบในตัวทำละลายอะซีโตนและเมทานอลในการสกัดสารจากเห็ด *Boletus edulis Boletus aestivalis* และ *Leccinum carpini* พบว่าสารสกัดหยาบในตัวทำละลายอะซีโตนของเห็ด *B. edulis* ให้คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดในตัวทำละลายอื่นของเห็ดทั้งสามชนิดโดยให้ค่า IC50 = 4.72 μg/mLซึ่งใกล้เคียวกับค่ามาตรฐานของกรดวิตามินซี IC50 = 4.22 μg/mL และ BHA (IC50 = 6.42 μg/mL) และ α-tocopherol (IC50 = 62.43 μg/mL) (Kosani *et al*, 2012) มีรายงานการพบสารโพลีแซคคาไรด์จากเห็ด Jisongrong ที่ถูกให้ทางปากของหนู rat เป็นเวลา 2 เดือน เปรียบเทียบกับหนูปกติพบว่า ลดระดับปฏิกิริยาที่เกิดจากการออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid peroxidation products) และมีการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Zhou and Chen, 2011) นอกจากนี้มีการศึกษาเห็ด 5 ชนิด โดยใช้เป็นตัวสกัด พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ด *Inonotus obliquus* ให้ผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า เห็ด 4 ชนิด ได้แก่ *Ganoderma lucidum, Lentins edodes, Tremella fuciformis* และ

Auricularia auricular แต่เมื่อทำการสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบของเห็ด *I. obliquus* มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (Zhang *et al*., 2015) มีข้อมูลในรายละเอียดของสารสกัดหยาบจากเห็ดบางกลุ่ม พบว่าโพลีแซคคาไรด์ของเห็ดกินได้ 4 ชนิดได้แก่ *Agaricus bisporus, Auricularia auricula, Flammulina velutipes* และ *Lentinus edodes* พบว่า สารสกัดหยาบของโพลีแซคคาไรด์ของเห็ด *A. bisporus* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (He *et al*., 2012) มีรายงานว่าสารประกอบฟินอลลิคและโปรตีนที่แทนที่ด้วยคาร์โบไฮเดรตมีการตอบสนองที่ดีเกี่ยวกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีแซคคาไรด์ในเห็ด (Siu *et al*., 2014) และในประเทศไทยได้มีรายงานของเห็ดท้องถิ่นบางชนิดเช่น เห็ดหิ้งเกือกม้า (*Phellinus rimosus*) เป็นเห็ดที่พบในภาคอีสาน สรรพคุณมีฤทธิ์ทางยา ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมทางการแพทย์แผนไทย สารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้าด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ สำหรับเห็ดเศรษฐกิจชนิดอื่นมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเหล่านั้น ได้แก่ เห็ดฟางที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Scavenging activity (%) of DPPH radical) (อรวัสสา และคณะ มมป.) เห็ด Boletus หลายชนิดมีฤทธิ์ในกาต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ได้แก่ *Boletus edulis* มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงและมีรสชาติที่อร่อย (Zhang *et al*., 2011) เห็ดบางชนิดสามารถเพาะเลี้ยงในรูปแบบเส้นใย ได้แก่ *Boletus aereus* ที่เลี้ยงแบบ submerged culture สามารถสร้างสาร exopolysaccharide ที่มีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สูงมาก (Zheng *et al*., 2014) การศึกษาเส้นใยของเห็ดตับเต่าจำพวก *Boletus colossus* โดยนำมาสกัดเย็นและสกัดร้อน เส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าด้วยวิธีการสกัดร้อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity และวิธี Reducing power มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ IC50= 85.59 µg/ml (พรพิมล 2558) นอกจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแล้วคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบของเห็ดเบื้องต้น

ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียนั้นนิยมใช้วิธีการ Agar well diffusion test และ Minimal inhibition concentration หรือ MIC สารสกัดหยาบของเห็ดหลายชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ส่วนสารสกัดเล็กตินจาก *Volvariella volvacea* MC131 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichai coli* ATCC 2592 (Mothong *et al*, 2010) สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลของเห็ด *Terfezia boudieri* ซึ่งเป็นเห็ด truffle ที่พบในแถบพื้นที่ทะเลทราย สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ 7 ชนิดได้แก่ *Enterococcus faecalis, S. aureus, Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, E. coli* และ *Pseudomonas aerunginosa* โดยให้ค่า MIC ตั้งแต่ 0.25 ถึง1.3 mg/ml (Hamza *et al*., 2016) สารสกัดหยาบของเมทานอลและเฮกเซนของเห็ด *Pleutrotus djamor* var. roseus มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC2079), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *E. coli* (ATCC 2567), *Klebsiella pneumonia* (ATCC 29665) และ *Pseudomonas aerunginosa* (ATCC 2036) ด้วยวิธี Agar well diffusion (Jegadeesh *et al*, 2014) สารสกัดหยาบของเห็ด *Pleurotus citrinopileatus* และ *Tricholoma crassum* Berk. ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทสามา

รถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* (ATCC 25923) และ *E. coli* (ATCC 25922) โดยให้ค่า MIC 5mg/ml และ 2.5 mg/ml ตามลำดับ (Chomcheon *et al*, 2013) สารสกัดหยาบของเห็ด *Ganoderma lucidum* ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Micrococcus sp*., *Enterobacter sp*., *Pseudomonas sp*., *E. faecalis*, *S. aureus*, *Salmonella sp*. ขณะที่สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มของเห็ดชนิดนี้ทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้เฉพาะเชื้อ *E. faecalis, Salmonella sp*. และ *Enterobacter sp*. (Rajesh and Dhanasekaran, 2014). เห็ดตับเต่าหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียเช่น สารสกัดหยาบเมทานอลและสารสกัดหยาบอะซิโตนของ*เห็ด Boletus aestivalis, Boletus edulis, Leccinum carpini* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งหรือ MIC อยู่ในช่วง 1.25 -10 mg/ml ในประเทศไทยได้มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบของเห็ดบางชนิด

เห็ดพื้นบ้านชนิดหนึ่งทางภาคใต้ของไทยและเป็นที่นิยมบริโภคคือ เห็ดเสม็ดซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Boletus griseipurpureus* Cornerในเวลาต่อมานักวิทยาศาสตร์บางท่านได้จัดจำแนกเห็ดชนิดนี้ในชื่อวิทยาศาสตร์ *Tylopilus plumbeoviolaceus* (Snell and Dick, 1941). เป็นเห็ดตับเต่าชนิดหนึ่ง พบได้ในภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกของประเทศไทย (Seehanan และ Petcharat, 2008) มีรายงานสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Staphylococcus aereus* และ *Escherichia coli* (Angajchariya, 2013) เห็ดเสม็ดจัดเป็นเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซ่นิดหนึ่ง เห็ดชนิดนี้มีราคาค่อนข้างสูงในทางภาคใต้ซึ่งเป็นเห็ดที่เกิดขึ้นตามฤดูกาลและเป็นอาหารที่นิยมบริโภคสำหรับคนท้องถิ่นภาคใต้ โดยปกติแล้วมีรสขม แต่คนท้องถิ่นมีวิธีการลดรสขมแล้วนำมาประกอบเป็นอาหาร เห็ดเสม็ดมีคุณค่าทางโภชนาการโดยมีปริมาณโปรตีนสูงและไขมันต่ำ (Aung-aud-chariya, *et al*, 2012) แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการเพาะเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์อย่างจริงจังรวมทั้งการวิจัยทางด้านฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดยังมีไม่มากพอ ดังนั้นการให้ความสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์เพื่อจะนำไปสู่การพัฒนาการอนุรักษ์เห็ดเสม็ดให้อยู่ร่วมกับป่าพืชอิงอาศัยในอนาคต เพื่อจะได้ปลูกจิตสำนึกในการอนุรักษ์เห็ดเสม็ดและการอนุรักษ์ป่าพืชอิงอาศัยควบคู่กันไป เพราะฉะนั้นการศึกษาเบื้องต้นในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้เห็ดเสม็ดมีประโยชน์กับมนุษย์มากขึ้น ไม่ใช่เพียงทางด้านอาหาร และในอนาคตเห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าอย่างเห็ดเสม็ดอาจจะเป็นเห็ดเศรษฐกิจ ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดและมีมูลค่าสูงยิ่งขึ้น

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเสม็ดบนอาหาร สังเคราะห์ต่างชนิดเพื่อดูอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเหล่านั้น
2. ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเห็ดเสม็ด
3. ศึกษาคุณสมบัติในการยับยังจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเห็ดเสม็ด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบอาหารสังเคราะห์ที่ทำให้เส้นใยเห็ดเสม็ดเจริญได้
2. ทราบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ด
3. ทราบฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเห็ดเสม็ดต่อแบคทีเรียบางชนิด
4. ได้ผลงานตีพิมพ์

บทที่ 2
วิธีในการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยเรื่องการศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์และฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดเสม็ด แบ่งงานออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกคือการศึกษาอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเห็ดเสม็ด ส่วนที่สองคือการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ส่วนที่สามศึกษาคุณสมบัติหรือฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด โดยมีวัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Melin Norkran medium หรือ MMN pH 5.6, Bolete medium, MMN ที่เติมที่เติมสารสกัดจากน้ำเห็ดเสม็ดสด 10%, Potato dextrose agar หรือ PDA
2. ลวดเขี่ยเชื้อรูปตัว L
3. ตู้ปลอดเชื้อ
4. แอลกอฮอล์ 70%
5. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. ตู้บ่มเชื้อ
7. ขวดรูปชมพู่ขนาด 200 ml, 500 ml และ1000 ml

8. น้ำ
9. เห็ดเสม็ด
10. เอทิลอะซีเตท (EtOAc)
11. เมทานอล (Methanol)
12. โหลแก้วที่ใช้หมัก
13. ผ้าขาวบาง
14. เครื่องปั่นน้ำผลไม้
15. เครื่องระเหยแห้ง
16. ตู้เย็น
17. MHA (Mueller Hinton Agar)
18. Tryptic soy agar หรือ TSA
19. Nutrient broth หรือ NB
20. Nutrient agar หรือ NA
21. Tryptic soy broth หรือ TSB
22. Cork borer
23. Autopipette ขนาด 1000 µl, 200 µl และ 1-20 µl
24. Tip
25. บีกเกอร์
26. พลาสติก wrap
27. ขวดสีชาสำหรับใสสารสกัดหยาบ
28. ปิเปตขนาด 5 ml, 10 ml
29. กระบอกใส่ปิเปต
30. ถุงพลาสติกขนาด 7x10, 12x18 นิ้ว
31. Laminar air flow

2.1 วิธีการทดลอง

2.1.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์

การเพาะเลี้ยงเส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดเสม็ดสดบนอาหาร Modified Melin Norkran medium หรือ MMN pH 5.6 ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียขนาด 90 mm บ่มที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 1-2 เดือน และทำการทดลองโดยตัดเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหาร MMN ด้วย cork borer ขนาด 6 mm ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อวางบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีแผ่นกระดาษเซลโลเฟนที่ตัดเป็นวงกลมซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง (De Araujo และ Roussos, 2002) อาหารสังเคราะห์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ เช่น MMN อาหารชนิดที่สองคือ MMN ที่เติมสารสกัดจากน้ำเห็ดเสม็ดสดโดยปรับปรุงจาก (Xu *et al*., 2008) อาหารชนิดที่สามคือ

Bolete medium (Ohta and Fujiwara, 2003) และอาหาร potato dextrose agar หรือ PDA หลังจาก 21 วัน นำกระดาษเซลโลเฟนที่มีเส้นใยเห็ดเสม็ดเจริญบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักเส้นใยก่อนหลังบนกระดาษเซลโลเฟน หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Kumla *et al*., 2011)

2.1.2 การศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเห็ดเสม็ด

ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดยการศึกษาผลของตัวทำละลาย 2 ชนิดคือสารละลายเมทานอล และสารละลายเอทิลอะซิเตด ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Angajchariya (2013) นำเห็ดเสม็ดแห้งที่ผ่านการอบด้วยเครื่อง food dehydrator นำเห็ดแห้ง 100 g มาบดด้วยเครื่องบดแล้วใส่ในขวดชมพู่ขนาด 1000 ml เติมตัวทำละลายเมทานอล 500 ml และนำเห็ดเสม็ดแห้งที่บดละเอียด 100 g ใส่ลงในขวดลูกชมพู่ขนาด 1000 ml ประยุกต์จาก แล้วสกัดผ่านกระบวนการสกัดและระเหยให้ตัวอย่างแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บตัวอย่างสารสกัดเห็ดเสม็ดไว้ที่ 4ºC ในส่วนของสารละลายเอทิลอะซิเตด ดำเนินการเช่นเดียวกับสารละลายเมทานอล แล้วนำมาคำนวณด้วยสูตร I%

I% = (Ablank Asample / Ablank) x100

A blank = the absorbance of the control reaction

A sample = the absorbance of the test compound

ตรวจสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลดังนี้คือ

1) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ด ใช้วิธีของ Zhang *et al*. (2013) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกในตัวอย่างหนัก 100 กรัมน้ำหนักสด โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร สำหรับ blank ใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 แทนตัวอย่างสารสกัด

2) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

วิเคราะห์ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) ในตัวอย่าง สารสกัดจากเห็ด ใช้วิธีของ Zhang *et al*. (2013) โดยใช้กรดแกลลิกและวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกหรือวิตามินซีในตัวอย่างหนัก 100 กรัม

น้ำหนักสด โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.07 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็น blank และในหลอดควบคุมใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 แทนตัวอย่างสารสกัด

3) ความสามารถในการต้านในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ด ใช้วิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานค่าในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก ในตัวอย่างหนัก 100 กรัมน้ำหนักสด โดยปิเปตตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย Frap reagent ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรสำหรับ blank ใช้เอธานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 แทนตัวอย่างสารสกัด

2.1.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์

ศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยการทดสอบการต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion method ตามวิธีการของ Sarker *et al* (2007) โดยใช้สารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในการยับยั้งแบคทีเรียตามวิธีการดังนี้

1) เตรียม Mueller Hinton Agar (MHA) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีปลอดเชื้อ เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อมาตรฐานใน สารละลาย 0.85% NaCl โดยเปรียบเทียบกับสาระละลายมาตรฐาน Mcfarland 0.5

2) ใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสารแขวนลอยของเชื้อที่เตรียมไว้ในข้างต้น แล้วกวาดให้ทั่วอาหาร MHA โดยเชื้อที่แตกต่างกันก็ใช้อาหารคนละจาน

3) เจาะหลุมขนาด 6 มม.โดยใช้ cork borer แล้วหยดสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ด แล้วบ่มจานอาหารที่ตู้บ่มอุณภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วสังเกตวงใสเพื่อดูการยับยั้งแบคทีเรีย

บทที่ 3

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

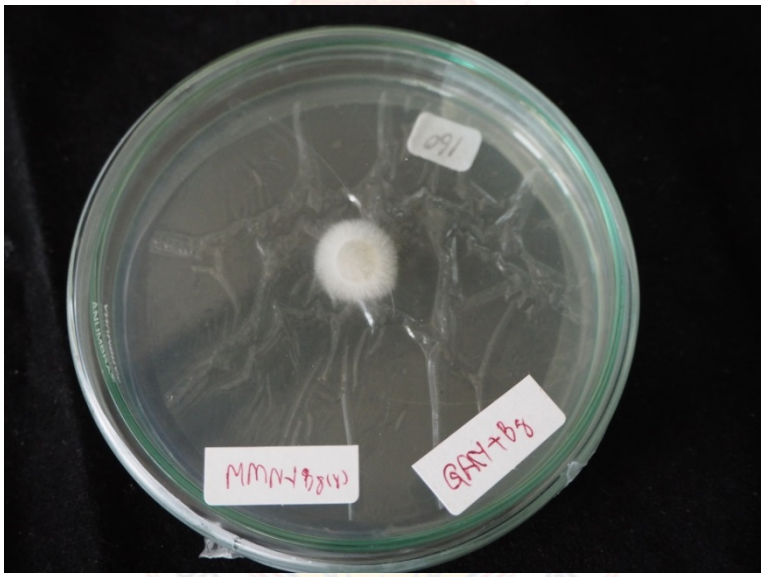
3.1การเพาะเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์

ดอกเห็ดเสม็ดที่เก็บได้จากป่าเสม็ดขาวในพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง (รูปที่ 3) นำมาเพาะในอาหารสังเคราะห์ Modified Melin Nokran Medium หรือ MMN ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันแล้วนำมาศึกษาต่อในอาหารสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ MMN, MMN ที่มีส่วนผสมสารสกัดเนื้อเยื่อเห็ดเสม็ดสดด้วยน้ำร้อน 10% (Xu *et al*., 2008) (รูปที่ 4) Boletus medium (Ohta and Fujiwara 2003) และ Potato Dextrose Agar (PDA) เส้นใยเห็ดเสม็ดที่เจริญในอาหาร MMN ที่มีส่วนผสม10% ของสารสกัดเนื้อเยื่อเห็ดเสม็ดสดด้วยน้ำร้อน มีค่าน้ำหนักแห้งของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดเสม็ดดีที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P<0.05$) รองลงมา คืออาหาร MMN และอาหาร Bolete medium ตามลำดับ และพบว่าเส้นใยเห็ดเสม็ดไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหาร PDA (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับงานวิจัย เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าบางชนิดสามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมจากสารสกัดธรรมชาติหรือธาตุอาหารรอง และวิตามิน *Lactorius insulus, Lactarius delicious* และ *Boletus edulis* สามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีส่วนผสมของ 20% น้ำสกัดจากต้นสน มันฝรั่ง และธาตุเหล็ก มักเนเซียม (Xu *et al*., 2008) ขณะที่มีรายงานว่าเชื้อเอกโตไมคอรไรซ่า *Tricholoma matsutake* และ *Rhizopogon roseolus* สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์ MMN และ PDA ที่มีการเติมธาตุอาหารรองและวิตามิน (Islam และOhga, 2013) เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าอย่าง *Phlebopus portentosus* สามารถเจริญได้บนอาหารสังเคราะห์ชนิด PDA แต่เส้นใยของ *P. portentosus* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร modified Murashige & Skoog หรือ MS และอาหาร fungal –host medium (Kumla และคณะ 2011) การเจริญของเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์เป็นการเจริญเติบโตเพียงระยะสั้นแล้วก่อหยุดการเจริญเติบโต อาจเป็นไปได้ที่การไม่เจริญเติบโตของเส้นใยเอกโตไมคอร์ไรบนอาหารสังเคราะห์มีสาเหตุจากเมตาบอลิซึมของเส้นใยราถูกยับยั้งด้วยความเข้มข้นของสารอาหารที่สูง การที่ในอาหารสังเคราะห์มีวิตามินและฮอร์โมนที่สูงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตเส้นใยรา (Hatakeyama และ Ohmasa 2004). สอดคล้องกับการวิจัยเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซ่ามักเจริญได้ช้าบนอาหารสังเคราะห์ (Mello *et al*., 2001) โดยปกติแล้วการเพาะเลี้ยงเอกโตไมคอร์ไรซ่า ปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงเอกโตไมคอร์ไรซ่านั้นเกิดการที่ยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับสภาพทางนิเวศวิทยาและปัจจัยความต้องการทางกายภาพของเชื้อรากลุ่มนี้ (Hall, 2003) มีเอกโตไมคอร์ไรซ่าไม่กี่ชนิดที่สามารถออกดอกได้ในสภาพการทดลองเช่น *Boletus reticulatus* (Yamada 2000) *Tylopilus catanieceps* (Kikuchi *et al*.,2009) ในขณะที่ *Phlebopus portentosus* หรือเห็ดห้าเชื่อว่าเป็นเป็นเห็ดที่มีคุณสมบัติกึ่งเอกโตไมคอร์ไรซ่า (putative ectomycorrhiza fungi) ซึ่งพบได้ทางภาคเหนือของประเทศไทย เห็ดชนิดนี้สามารถออกดอกได้โดยปราศจากพืชอิงอาศัย (Kumla et al., 2012) ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้มีความจำเป็นในการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

ตารางที่ **1** น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

Type of medium	Dried weight (X±SD)
MMN	0.012 ± 0.0015^{bc}
MMN+ 10% extract fresh Bg	0.0169 ± 0.0017^{c}
PDA	0^{a}
Boletes medium	0.008 ± 0.0054^{b}

ค่าเฉลี่ย (n = 3) พร้อมกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พยัญชนะตัวห้อยที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยการทดสอบ Duncan's multiple range test ($P<0.05$)



รูปที่ 4 เส้นใยเห็ดเสม็ดบนอาหารสังเคราะห์ MMN ที่เติมน้ำสกัดเห็ดเสม็ดสด 10%

3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ด

ผลจากการคำนวณด้วยสูตรเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายของเมทานอลจากเห็ดเสม็ดแห้งมีค่ามากกว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายของเอทิลอะซีเตท

และการทอสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดด้วยวิธี DPPH และ Ferric Reducing Antioxidant power (FRAP) ซึ่งวิธี DPPH ได้เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารอย่างแพร่หลาย (Cottelle *et al*, 1996) ผลจากการวิเคราะห์พบว่ากิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในตัวทำละลายเมทานอลมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดด้วยเอทิลอะซีเตท (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของพืชที่ค่อนข้างสูงมักมีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลลิค (Velioglu *et al*, 1998) ซึ่งคล้ายคลึงกับสารประกอบฟีนอลลิคในเห็ดซึ่งมีข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก และเป็นสารที่ช่วยในการส่งเสริมสารเคมีตัวอื่นที่ทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น ซึ่งไม่ใช่สารก่อกลายพันธุ์ (Ishikawa *et al*., 1984) ในประเทศมาเลเซียมีเห็ด *Boletus spp*. หรือ เห็ดในภาษาท้องถิ่นเรียก เห็ด Gelam ที่มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับดอกเห็ดเสม็ดของไทยและมีการยืนยันว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอาหารท้องถิ่นที่คนในประเทศมาเลเซียนิยมบริโภค (Yuswan *et al*., 2013) มีข้อมูลของเห็ด Gelam ในเมือง Tok Bali Kelantan ของประเทศมาเลเซีย มีการศึกษาในด้านการสารสกัดของเห็ดชนิดนี้มีโอกาสในการป้องกันโรคเบาหวาน มะเร็งปากมดลูก มะเร็งทรวงอก (Muniandy *et al*, 2016)

ตารางที่ 2 การทดสอบการต้านอนุมลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในตัวทำละลาย 2 ชนิด

Solvent	**Radical scavenging activity**			**Sig.**
	% yield	DPPH (µg vitamin C/g sample)	FRAP (µg gallic acid/g sample)	
Bg ETOAc	2.8719	77.959 ± 0.457	19.072 ± 0.047	*
Bg MeOH	6.2304	200.356 ± 4.490	65.351 ± 0.247	*
	Sig.	*	*	

*Statistical significance (P<0.05) by Independent-samples t test

3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดแห้ง

ผลการทดลองในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ด ด้วยวิธี agar well diffusion ด้วยเชื้อโรค 2 สายพันธุ์ได้แก่ *Entercoccus faecalis* TISTR 379 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370 ซึ่งแสดงความไวในการตอบสนองต่อสารต้านจุลชีพ (Alves *et al*, 2012) ในการทดลองการตรวจสอบคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด พบว่า สารสกัดเอทิลอะซีเตทจากดอกเห็ดเสม็ดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Ps. aeruginosa* TISTR 2370 โดยวงใสยับยั้งการเจริญเติบโตมีขนาดเท่ากับ 17.33$\pm$1.155 mm และขนาดวงใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* TISTR 379 มีขนาดเท่ากับ 13.33$\pm$2.082 mm (ตารางที่ 3) เมื่อมีการเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเมทานอลของเห็ดเสม็ดซึ่งสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อ *Ps. aeruginosa* TISTR 2370 ซึ่งให้ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตมีขนาดเท่ากับ 15.33$\pm$0.577 mm ซึ่งข้อมูลสอดคล้องกับการรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดหยาบของตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทของเห็ด *Lenzites quercina* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* (Ogidi *et al*., 2015) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียของเห็ดเสม็ดที่เคยมีรายงานเพียงเบื้องต้นว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 2 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 29523 และ *Esherichia coli* ATCC 25922 ด้วยวิธี agar well diffusion (Aung-aud-chariya *et al*., 2015) ควรมีการเพิ่มชนิดของเชื้อแบคทีเรียรวมถึงเชื้อราเพื่อให้ข้อมูลในการทดสอบคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียนั้นมีมากขึ้นจะได้ทราบประสิทธิภาพของสารสกัดเห็ดเสม็ดในตัวทำละลายทั้งสองชนิดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ตารางที่ 3 วงใสจากการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิดด้วยสารสกัดหยาบของเห็ดเสม็ดในตัวทำละลาย 2 ชนิด

Bacterial strain	Inhibition zone of BgETOAC (200mg/ml) (mm) $\overline{X}\pm$ SD	Inhibition zone of BgMeOH (200mg/ml) (mm) $\overline{X}\pm$ SD
Pseudomonas aerunginosa TISTR 379	17.33 ± 1.155^{b}	15.33 ± 0.577^{ab}
Enterococcus faecalis TISTR 2370	13.33 ± 2.082^{a}	0*

Values are means (n = 3) with standard deviations. Subscripts with different common letters are significant by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). *No inhibition zone was observed. Hence, this treatment was excluded from one-way ANOVA (Gomez and Gomez, 1984)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เห็ดเอกโตไมคอร์ไรซ่าที่กินได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเช่น การเป็นแหล่งอาหาร แต่ความรู้ในเรื่องประโยชน์ของสุขภาพยังคงไม่สมบูรณ์ เช่นเดียวกับเห็ดเสม็ด (*B. griseipurpureus* Corner) ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ที่เกิดขึ้นตามฤดูกาลและเป็นที่นิยมในการบริโภคในภาคใต้ของประเทศไทย เชื้อเห็ดเสม็ดสามารถเจริญเติบโตบนอาหาร MMN ที่มีการเติมสารสกัดเห็ดเสม็ดสดจากน้ำร้อนประมาณ 10% ซึ่งเห็ดชนิดนี้มีคุณค่าทางด้านอื่นด้วยไม่เพียงแต่มีคุณค่าทางด้านอาหาร จากผลการศึกษานี้ได้รับการยืนยันว่า เห็ดเสม็ดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและมีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ซึ่งในอนาคตควรมีการศึกษาในเชิงลึกมากขึ้นเกี่ยวกับพฤกษเคมีของเห็ดชนิดนี้เพื่อนำไปประยุกต์ทางการแพทย์หรือการนำเห็ดเสม็ดมาประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารซึ่งจำเป็นจะต้องศึกษาคุณสมบัติทางยาของเห็ดเสม็ดให้มากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กิตติมา ด้วงแค (มปป) กลุ่มงานกีฏวิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช

จันจิรา อายะวงศ์ วินันท์ดา หิมะมาน กิตติมาด้วงแค บารมี สกลรักษ์ และกฤษณา พงษ์พานิช (มปป) การศึกษานิเวศวิทยา การกระจายพันธุ์และการทดสอบคุณลักษณะไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะ ส า นักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืชกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่า และพันธุ์พืช

ธารทิพย์ รัตนะ และธนาการ แสงสง่า 2559 สมบัติต้านอนุมูลอิสระและพรีไบโอติกของเห็ดป่าสะแกราช วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24(4):538-550.

ปิยะวัฒน์ พรหมรักษา และโกสินทร์ พัฒนมณี. 2552. ป่าเสม็ด ผืนป่าที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์ เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน.สถาบัน ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. วารสารสิ่งแวดล้อม ปีที่ 13 เล่มที่ 3

พรพิมล กิจวิชา (2558). การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลีแซคคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า ปัญหาพิเศษโครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ (มปป). เห็ดผึ้งยูคา/*Tylopilus plumbeoviolaceus* http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/

พรรณพร กุลมา และ ปิยะนุช สินันดา (2554). เห็ดป่ารับประทานได้และมูลค่าราคาในจังหวัดน่าน วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ ปีที่ 14 (3) ฉบับพิเศษ 65-75 .

ลัดดาวัลย์ แก้วส่งแสง, อมรรัตน์ อังอัจฉะริยะ, สุวิทย์ จิตรภักดี, ขวัญตา ตันติกำธน และ อเนก สาวะอินทร์ (2560) การเปลี่ยนแปลงปริมาณอินทรียวัตถุและฟอสฟอรัสในดินบริเวณพื้นที่พืชอิงอาศัยของ เห็ดเสม็ดในจังหวัดตรัง ประชุมวิชาการครั้งที่ 55 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 31 มกราคม ถึง 3 กุมภาพันธ์ 2560.

สุนัดดา ญาติโยม (มปป). ไมคอร์ไรซ่า สาขาชีววิทยา สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี http://biology.ipst.ac.th/?p=903

สมสงวน ปัสสาโก, อังศุมา ก้านจักร, ชมภู่ เหนือศรี และวรรณภา เหลี่ยมสิงห์ขร. 2557. “ภูมิปัญญาท้องถิ่นในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในป่าชุมชนโคกใหญ่เพื่อการใช้ประโยชน์

อย่างยั่งยืน". วารสารวิจัยเพื่อพัฒนาสังคมและชุมชน มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีที่ 1 ฉบับที่ 2. 95-109.

Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A. and Pintado, M. (2012). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. Journal of Applied Microbiology 113: 466-475.

Aung-aud-chariya, A., Bangrak, P., Lumyong, S. Worrapong, P., Aggangan, N.S., and Kamlangdee, N. (2015). RNA polymerase II secondary largest molecular identification of *Boletus griseipurpureus* Corner from Thailand and antibacterial activity of basiocarp extracts. Jundishaphur Journal of Microbiology 8(3): e15552

Aung-aud-chariya, A., Bangrak, P., Dell, B., Lumyong, S. and Kamlangdee, N. (2012). Preliminary molecular identification of *Boletus griseipurpureus* Corner from Thailand and its nutritional value. Journal of Agricultural technology 8(6): 1989-1996

Brundrett M., Bougher N., Dell B., Grave T. and Malajczuk N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32, Canberra. 374 pp

Chomcheon, P., Kheawkum, B., Sriwiset, P., Dulsamphan, S. and Dulsamphan, C. (2013). Antibacterial activity of crude extracts from edible mushrooms *Pleurotus citrinopileatus* and *Tricholoma crassum* Berk. Thai J. Pharm. Sci. 37:107-111.

De Araujo, A. A. and Roussos, S. (2002). A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar media. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100: 311-318.

Gomez, K. A. and Gomez, A. A. (1984). Statistical procedures for agricultural research (2 ed.). John Wiley and Sons, NewYork, 680p.

Hall, R. I., Yun, W. and Amicucci, A. (2003). Cultivation of ectomycorrhizal mushrooms. TRENDS in Biotechnology, 21(10): 443-448.

Hamza A., Zouari, N., Zouari, S., Jdir, H., Zaidi, S., Gtari, M. and Neffati, M. (2016). Nutraceutical potential, antioxidant and antibacterial activities of *Terfezia*

boudieri Chatin, a wild edible dessert truffle from Tunisia arid zone. Arabian Journal of Chemistry 9: 383-389.

He, J. Z., Ru, Q. M., Dong, D. D. and Sun, P. L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. Molecules 17: 4373–4387.

Islam, F., and Ohga, S. (2013). Effects of media formulation on the growth and morphology of ectomycorrhizae and their association with host plant. Agronomy 1-12.

Ishikawa, Y., Morimoto, K. and Hamasaki, T. (1984). Flavoglaucin, a metabolite of Eurotium chevalieri, its antioxidation and synergism with tocopherol. Journal of American Oil Chemists' Society 61: 1864–1868.

Jegadeesh, R., Hariprasath, L., Kurmaresan, K. and Raaman, N. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activities of fractionized extracts of edible mushroom *Pleurotus djamor* var. roseus. Journal of Academia and Industrial Research 3(5):202-208.

Kosani, M., Rankovic, B. and Dasic, M. (2012). Mushroom as possible antioxidant and antimicrobial agents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 11(4): 1095-1102.

Kumla, J., Danell, E., Bussaban B. and Lumyong, S. (2011). Suitable growth conditions and nutrient factors on in vitro culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). Chiang Mai Journal Science 38(1):156-159.

Lau M. F. (2014). Identification and factors that affecting the growth of the indigenous mushroom, Boletus sp. in Bachok Kelantan, Malaysia. Master degree of Science Universiti Sains Malaysia

Muniandy, S., Daud, F., Senafi, S., Noor, M. N., Kumaran, M., Alwi, A. N. A. M. *et al*. (2016). Active compound, antiproliferative and effect on stz induced zebrafish of various crude extracts from *Boletus qriseipurpureus*. Malaysian AppliedBiology 45: 69-80.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., Roytrakul, S., Siripong, P. & Rodtong, S. (2010). Biological activity of straw mushroom lectin. National Science and Technology Fair 2010, Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand, 7th-22nd August, 2010.

Ogidi, O. C., Oyetaya, V. C. and Akinyele, B. J. (2015). In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of extracts obtained from raw and fermented wild macrofungus, *Lenzites quercina*. International Journal of Microbiology 7 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/106308

Ohta, A. and Fujiwara, N. (2003). Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus Boletus in pure culture. Mycoscience 44: 95-300.

Rajesh K. and Dhanasekaran, D. (2014). Phytochemical Screening and Biological Activity of Medicinal Mushroom Ganoderma species. Malaya Journal of Biosciences 1(2): 67-75.

Rossi, M. J. and Oliveira, V. L. (2011). Growth of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in different nutritional conditions. Brazilian Journal of Microbiology 42(2): 624–632.

Sarker, S. D., Nahar, L., and Kumarasamy, K. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods 42: 321-324.

Snell, W.H., Dick, EA. (1941). "Notes on boletes. VI". Mycologia 33(1): 23–37

Seehanan, S. and V. Petcharat (2008). Some species of wild boletes in Thailand. J. Agric. Tech. 4:109-118.

Siu, K. C., Chen, X. and Wu, J. Y. (2014). Constituents actually responsible for the antioxidant ctivities of crude polysaccharide isolated from mushroom. J. Funct. Foods. 548-556.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Ooma, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4113–4117.

Yuswan, M. H. M. Y., Al-Obaidi, J., Rahayu, A., Sahidan, S. , Shazrul, F. and Fauzi, D. (2015). New bioactive molecules with potential antioxidant activity from various extracts of wild edible gelam mushroom (*Boletus spp*.). Advances in Bioscience and Biotechnology 6: 320-329.

Zheng, J., Wang J., Shi C. et al., 2014. Characterization and antioxidant activity for exopolysaccharide from submerged culture of *Boletus aereus*. *Process Biochemistry* 49(6): 1047-1053.

Zhang, J. J., Li, Y., Zhou, T., Xu, D., Zhang, P., Li, S. and Li, H. B. (2016). Bioactivities and health of mushroom mainly from China. Molecules 938: 1-16.

Zhang, N., Chen, H. X., Zhang, Y., Xing, L.S., Li, S.Q., Wang, X. M. and Sun, Z. (2015). Chemical composition and antioxidant properties of five edible Hymenomycetes mushrooms. Int. J. Food Sci. Technol. 50: 465–471.

Zhou, L. B. and Chen, B. (2011). Bioactivities of water-soluble polysaccharide from Jisongrone mushroom Antibreast carcinoma cell and antioxidant potential. Int.J.Biol.Macroal. 48:1-4