

ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้าวต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156[†]

ภัทรพล พูลสุขโข^{1,*}, เกศแก้ว พูลรักษา¹, วชิรชัย พงษ์ประภาพ², ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์³ และ เอก แสงวิเชียร¹

¹หน่วยวิจัยไลเคน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง บางกะปิ กรุงเทพมหานคร 10240

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ บางกะปิ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร 10240

³สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพที่ กรมวิชาการเกษตร อำเภอลองหลวง ปทุมธานี 12110

*อีเมล: pakpoon.p@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 จากสารสกัดที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากข้าวชนิดต่างๆ โดยทำการแยกสปอร์ของราก่อให้เกิดไลเคน เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจนโคโลนีพัฒนาและสร้างสารทุติยภูมิเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แล้วนำมาสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่า สารสกัดจากราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MYA มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ EC₅₀ ดีที่สุดคือ 0.41 มิลลิกรัม BHT/mL รองลงมาคือ สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดข้าวสาลีและข้าวหอมมะลิ มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ EC₅₀ คือ 0.55 และ 0.64 มิลลิกรัม BHT/mL ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณสารฟีนอลิกรวมพบมากสุดในสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดข้าวสาลี มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม คือ 0.234 มิลลิกรัม GAE/mg extract รองลงมาคือ สารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดข้าวหอมมะลิและ MYA มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม คือ 0.211 และ 0.188 mg GAE/mg extract ตามลำดับ และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดข้าวบาร์เลย์ทำให้สารสกัดจากราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (EC₅₀ > 1 มิลลิกรัม BHT/mL) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่วัดได้น้อย (0.086 มิลลิกรัม GAE/mg extract) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าชนิดของข้าวที่นำมาทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวม ซึ่งมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้

คำสำคัญ: ไลเคน, ราก่อให้เกิดไลเคน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

Abstract

Antioxidant activities and total phenolic content from lichen forming fungi (LFF) *Ocellularia* sp. NKP156 growing on culture media with rice as composition (Jasmin rice, Wheat, Barley and Malt extract) were evaluated. The LFF were grown for 12 weeks for colony development and secondary metabolites were produced and mycelium were extracted with ethyl acetate and subsequence dried. Antioxidant activity was analyzed by DPPH assay and total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method. The results showed that the maximum value of high antioxidant capacity at 50% effective concentration (EC₅₀) 0.41 mg BHT/mL from MYA, following by crude extracts from Wheat, and jasmine rice which showed EC₅₀ values at 0.55 and 0.64 mg BHT/mL, respectively. The total phenolic content was also determined and results from wheat, jasmine rice and MYA medium showed values at 0.234, 0.211 and 0.188 mg GAE/mg extract, respectively. Crude extracts from the medium with barley represented low antioxidant activity (EC₅₀ > 1 mg BHT/mL), which corresponds to the less measured total phenolic compounds (0.086 mg GAE/mg extract). This result demonstrated that the type of media which had rice as composition represented candidate for production of antioxidants and total phenolic content.

Keywords: Lichen, Lichen forming fungi, Antioxidant activities, Total phenolic content

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ขสมรณะปฏิบัติงานวิชาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

บทนำ

ไลเคนเกิดจากการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (symbiosis) ของราและสาหร่ายสีเขียว โดยร่าก่อให้เกิดไลเคนจะทำหน้าที่ผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) และขับออกมาสะสมอยู่ภายนอกเส้นใยรา สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารอินทรีย์ (Elix & Stocker-Wörgötter, 2008) โดยมากจะเป็นสารที่พบได้เฉพาะในไลเคนเท่านั้น มีรายงานโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มนี้แล้วประมาณ 1,000 ชนิด ซึ่งมีเพียงส่วนน้อยประมาณ 50-60 ชนิด ที่สามารถพบได้ทั้งในไลเคน ราทั่วไปและพืชชั้นสูง (Molnar & Farkas, 2010) โดยที่สารเหล่านี้มีศักยภาพที่ในการนำมาใช้ประโยชน์ ในขณะที่ไลเคนในธรรมชาติมีอัตราการเติบโตที่ช้ามาก ในขณะที่ร่าก่อให้เกิดไลเคนหลายชนิดถูกแยกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ ราเหล่านี้ผลิตสารทุติยภูมิทั้งที่เหมือนในธรรมชาติและแตกต่างออกไป อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่ทำให้ร่าก่อให้เกิดไลเคนได้รับความสนใจน้อยเนื่องจากรากลุ่มนี้มีการเติบโตช้า และร่าก่อให้เกิดไลเคนหลายชนิดไม่สามารถแยกออกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้

Ocellularia เป็นสกุลไลเคนในวงศ์ Graphidaceae มีรูปแบบการเติบโต (growth form) แบบครัสโตส (crustose) พบขึ้นอยู่บนเปลือกไม้ ไลเคนในวงศ์นี้สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive structure) ได้หลายแบบ บางชนิดสร้างแอโพทีเซียแบบริมฝีปากหรือลายเส้น (lirellate apothecia) และบางชนิดสร้างแบบเพอริเทเซีย (perithecia) ไลเคนสกุล *Ocellularia* มีรายงานว่าพบมากกว่า 300 ชนิด ทั่วโลก (Lücking et al., 2017) มีสารทุติยภูมิที่สำคัญในกลุ่ม orcinol depsidone (Mangold et al., 2009)

จากงานวิจัยของ สร้อยกัญญา จารุพินทุโสภณ (2560) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากร่าก่อให้เกิดไลเคนในประเทศไทย โดยทำการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้าง พบสารหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มแซนโทน แอนทราควิโนน แนนโทควิโนน ฟินาลิโนน เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ของความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่า มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HCT116 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 นอกจากนี้ (Luangsuphabool et al., 2012) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของร่าก่อให้เกิดไลเคน *Trypethelium eluteriae* พบว่า สารสกัดจากร่าก่อให้เกิดไลเคนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.18 mg BHT/ml ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.24 mg/ml

การเลี้ยงร่าก่อให้เกิดไลเคนในห้องปฏิบัติการมักนิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Malt Yeast Extract (MYA) โดย malt extract นั้นได้มาจากข้าว อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้มีราคาสูงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ในขณะที่ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวจำนวนมากหากนำข้าวในประเทศมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากจะเป็นการทดแทนการนำเข้าแล้วยังเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้นได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของร่าก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 จากสารสกัดที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ข้าวชนิดที่แตกต่างกัน

วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการแยกและเลี้ยงสปอร์ร่าก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 โดยวิธีของ (Sangvichien et al., 2011) จากนั้นเลี้ยงเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำมาจากข้าวชนิดต่างๆ ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และ MYA โดยการนำเมล็ดข้าวไปปั่นให้เป็นผงแล้วนำผงข้าวที่ได้ไปเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ทดแทน Malt Extract (ผงข้าว 40 กรัม, ผงวุ้น 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 12 สัปดาห์ แล้วนำมาสกัดสารทุติยภูมิในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และเก็บสารสกัดไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

วิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (radical scavenging activity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ (Amarowicz et al., 2004) โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยเมทานอลและปรับให้มีความเข้มข้น 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.1250, 0.2500 และ 0.5000 mg/ml เติมน้ำสารสกัดที่เตรียมไว้ (test sample) และสารละลาย methanolic DPPH radical ลงในหลุมของจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกชนิด 96-well plate ให้ได้ปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 200 μ l (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) โดยแบ่งการทดสอบเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุด A (test sample) = Test sample 100 μ l + Methanolic DPPH radical 100 μ l

ชุด B (blank of test sample) = Test sample 100 μ l + Methanol 100 μ l

ชุด C (control) = Methanol 100 μ l + Methanolic DPPH radical 100 μ l

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

$$\% \text{Radical scavenging} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ ชุด C และ A sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของชุด A - ค่าดูดกลืนแสงของชุด B

และหาค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ด้วยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical scavenging) กับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่กับสารมาตรฐาน (BHT)

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ (Folin et al., 1927) โดยสร้าง calibration curve จากสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน Absolute Ethanol ความเข้มข้น 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.1250, 0.2500 และ 0.5000 mg/ml เติมนลงใน 96-well plate หลุมละ 20 μ l เติมนสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 μ l ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีและเติมนสารละลาย Sodium bicarbonate (Na_2CO_3) 80 μ l ทั้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm แล้วทำการทดสอบสารสกัดด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับสารมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณ total phenolic compound (mg/ml) จากกราฟมาตรฐานของสาร gallic acid ในหน่วยของสารสกัด mg GAE/mg extract

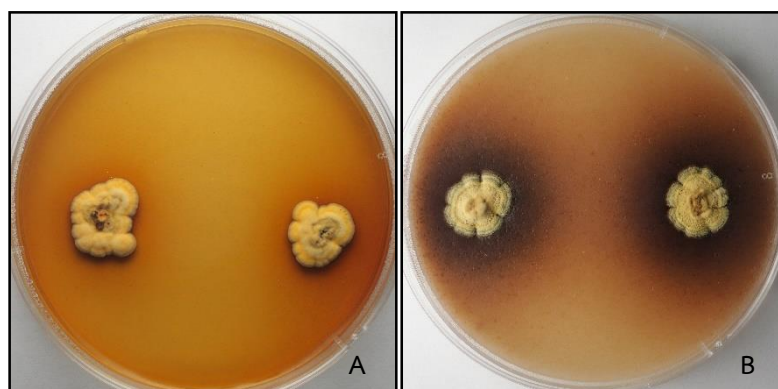
ผลและอภิปรายผล

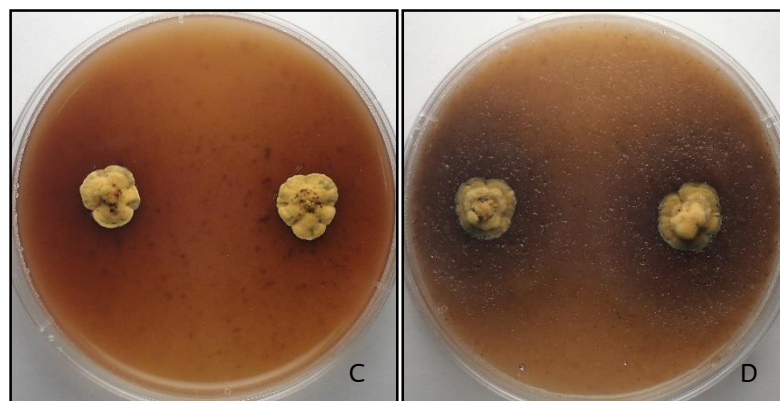
ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณราก่อให้เกิดไลเคนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำมาจากข้าวชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และ MYA เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยมีลักษณะของโคโลนี ดังแสดงในภาพที่ 1 นำไปสกัดสารด้วยเอทิลอะซิเตทเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้ BHT เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ พบว่า มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.06 mg/ml และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากรา *Ocellularia* sp. NKP156 ที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้งสี่ชนิด พบว่า สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิด MYA มีค่า EC_{50} ดีที่สุดคือ 0.41 mg/ml รองลงมาคือ สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวสาลี มีค่า EC_{50} คือ 0.55 mg/ml สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวหอมมะลิ มีค่า EC_{50} คือ 0.64 mg/ml ในขณะที่สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวบาร์เลย์ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($EC_{50} > 1$ mg/ml)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยคำนวณจาก linear regression equation ของกราฟมาตรฐานโดยใช้ gallic acid ($y = 0.0052x + 0.0739$, $R^2 = 0.9997$) โดย Y = gallic acid equivalents และ x = ค่าดูดกลืนแสง พบว่า สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวสาลีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ 0.234 mg GAE/mg extract รองลงมาคือสารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวหอมมะลิ เท่ากับ 0.211 mg GAE/mg extract สารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยอาหาร MYA เท่ากับ 0.188 mg GAE/mg extract และสารสกัดจากราที่เลี้ยงด้วยข้าวบาร์เลย์ มีสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุดเท่ากับ 0.086 mg GAE/mg extract

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมพบว่า สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากข้าวสองชนิดคือ ข้าวสาลีและข้าวหอมมะลิ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใกล้เคียงกับสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MYA ในขณะที่สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากข้าวบาร์เลย์ ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด





ภาพที่ 1 โคลนของราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ได้แก่ (A) Malt-Yeast Extract Agar (MYA), (B) ข้าวหอมมะลิ, (C) ข้าวสาลี และ (D) ข้าวบาร์เลย์

ตารางที่ 1 แสดงค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ EC_{50} และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ชนิด

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ EC_{50} (mg BHT/ml)	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/mg extract)
MYA	0.41	0.188
ข้าวหอมมะลิ	0.64	0.211
ข้าวสาลี	0.55	0.234
ข้าวบาร์เลย์	2.38	0.086
BHT (สารมาตรฐาน)	0.06	

สรุปผล

สารสกัดจากราก่อให้เกิดไลเคน *Ocellularia* sp. NKP156 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากข้าวหอมมะลิและข้าวสาลี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเช่นเดียวกับการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MYA โดยสารสกัดจากการเลี้ยงด้วยอาหาร MYA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ในขณะที่การเลี้ยงด้วยอาหารที่ทำจากข้าวสาลีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณ และขอขอบคุณหน่วยวิจัยไลเคน มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้การอนุเคราะห์ตัวอย่างไลเคนสำหรับการศึกษา

บรรณานุกรม

- สื่อภิญญา จารุพินทุโสภณ. (2560). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จากไลเคนและราในไลเคนวงศ์ *Trypetheliaceae* (วิทยานิพนธ์ปริญญาโท) บัณฑิต. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84(4), 551–562.
- Elix, J. A., & Stöckert-Wörgötter, E. (2008). *Biochemistry and secondary metabolites* (pp. 104–133). In Nash III, T. H. (Ed.). Lichen biology. New York: Cambridge University Press.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.

- Luangsuphabool, T., Sanglarpcharonekit, M., Piepukiew, J. & Sangvichien, E. (2012). *Effect of culture medium on antioxidant activity from Trypethelium eluteriae TSL35* (pt-057). In the Proceeding of the International Conference on Microbial Taxonomy Basic and Applied Microbiology. Thailand: KhonKaen University.
- Lücking, R., Hodkinson, B. P., & Leavitt, S. D. (2017). The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera. *The Bryologist*, 119(4), 361-416.
- Mangold, A., Elix, J. A. & Lumbsch, H. T. (2009). *Thelotrema* family. *Flora of Australia*, 57, 195–420.
- Molnára, K. & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of Lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173.
- Sangvichien, E., Hawksworth, D., & Whalley, A. (2011). Ascospore discharge, germination and culture of fungal partners of tropical lichens, including the use of a novel culture technique. *IMA Fungus*, 2(2), 143-153.