รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสกัดเบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูและการทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติก
Extration of β-glucan from *Auricularia auricula* Judae and evaluation on their prebiotic effect

ผศ.ดร.สันทัด วิเชียรโชติ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556
รหัสโครงการ AGR560139S คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ชื่อโครงการเดี่ยว

(ภาษาไทย) **การสกัดเบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูและการทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติก**

(ภาษาอังกฤษ) **Extration of β-glucan from *Auricularia auricula* Judae and evaluation on their prebiotic effect**

คณะนักวิจัยและคณะ/หน่วยงานต้นสังกัด

ผู้รับผิดชอบและหน่วยงาน

หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันทัด วิเชียรโชติ

สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หน่วยงานวิจัยหลัก

สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

โทรศัพท์ 0-7428-9494 โทรสาร 0-7421-2889

หน่วยงานวิจัยสนับสนุน

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การสกัดเบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูและการทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติก
แหล่งเงิน (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 400,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม...2555 ถึง กันยายน...2556
หัวหน้าโครงการ
ผศ.ดร.สันทัด วิเชียรโชติ หน่วยงานที่สังกัด สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

เบต้า-กลูแคน คือสารประกอบประเภทน้ำตาลหลายโมเลกุล (พอลิแซคคาไรด์) มีคุณสมบัติเป็นใยอาหาร (dietary fiber) จากผนังเซลล์ของยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*), ธัญพืช (ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์) และเห็ด โครงสร้างหลักของเบต้า-กลูแคนจากยีสต์และเห็ดประกอบด้วย β-1,3-glucans และ β-1,6-glucans ตามลำดับ สารเหล่านี้มีสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้มีรายงานว่า เบต้า-กลูแคนยังมีคุณสมบัติป้องกันมะเร็ง ลดระดับคอเลสเตอรอล ประเทศไทยมีเห็ดบริโภคได้ทางการค้าหลายชนิด เห็ดบริโภคได้ 8 ชนิดได้ถูกคัดเลือกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเบต้า-กลูแคน โดยพบปริมาณเบต้า-กลูแคนใน เห็ดแครง, เห็ดนางรม, เห็ดนางฟ้า, เห็ดหูหนู, เห็ดฟาง, เห็ดหอม, เห็ดเข็มทอง และเห็ดเสม็ด ร้อยละ 59.87, 37.61, 32.93, 31.51, 27.85, 25.50, 19.37 และ 12.09 ตามลำดับ เห็ดหูหนูได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเบต้า-กลูแคน โดยพบว่าเห็ดหูหนูสีน้ำตาลมีต้นทุนวัตถุดิบต่อปริมาณเบต้า-กลูแคนต่ำสุด (2.38 บาท/กรัมเบต้า-กลูแคน) ประกอบด้วยใยอาหารทั้งหมด (total dietary fiber, TDF) ร้อยละ 6.00 ซึ่งเป็นใยอาหารชนิดละลายน้ำ (soluble dietary fiber, SDF) ร้อยละ 5.57 และ ใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble dietary fiber, IDF) ร้อยละ 0.46

การสกัดเบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 121 °C และความดันสูง เป็นเวลา 30, 45 และ 90 นาที โดยนำผงเห็ดหูหนูมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสก่อนที่ระดับ 50 U/ml เป็นเวลา 360 นาที หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วยเครื่อง High Perfomance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) ผลการทดลองพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 121 °C ที่เวลาต่างๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ของน้ำหนักโมเลกุลเบต้า-กลูแคน 10^4-10^5 Da และปริมาณเบต้า-กลูแคน (49.92%) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสกัดเป็น 130 °C พบว่าเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10^4-10^7 Da สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเบต้า-กลูแคนคือ 130 °C 30 นาที ส่วนของสารสกัดและกากตะกอนประกอบด้วยเบต้า-กลูแคน 9.08% และ 36.59% ตามลำดับ

การทำบริสุทธิ์เบต้า-กลูแคนเพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยใช้เมมเบรนระดับอัลตร้าฟิลเตรชั่นขนาด 5, 10 และ 30 kDa อัตราเร็วการไหลของตัวอย่าง 1 m/s ความดัน 1.5 bar และใช้โหมดความเข้มข้น หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วยเครื่อง HPSEC พบว่า เมมเบรนขนาด 30 kDa สามารถกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ดีที่สุด

ผลการศึกษาเบต้า-กลูแคนต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ คือ *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (BB-12) และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1465 โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาลสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* TISTR 1465 โดยการเพิ่มปริมาณของเชื้อ 5.13×10^6 เป็น 2.37×10^7 CFU/ml อินนูลินส่งเริมการเจริญเติบโตของ BB-12 ได้ดีโดยเพิ่มขึ้นจาก

1.01×10^8 เป็น 3.73×10^8 CFU/ml เบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาลส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ BB-12 ได้สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 1.40×10^8 เป็น 1.49×10^8 CFU/ml สรุปได้ว่า เบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาลจำเพาะต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* TISTR 1465 มากกว่า BB-12 ดังนั้นเบต้า-กลูแคนจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาลจึงมีสมบัติเบื้องต้นเป็นพรีไบโอติก

คำสำคัญ : เบต้า-กลูแคน, เห็ดหนูหนู, พรีไบโอติก, โพรไบโอติก

Research Title: Extration of ß-glucan from *Auricularia auricula* Judae and evaluation on their prebiotic effect

Researcher: Asst. Prof. Dr. Santad Wichienchot

Faculty: Agro-Industry **Department:** Nutraceutical and Functional Food Research and Development Center Prince of Songkla University

ABSTRACT

ß-glucan is a dietary fiber-type complex sugar (polysaccharide) derived from the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), cereals (oat and barley), and mushrooms. Principally, yeast and mushroom contains a mixture of mainly ß-1,3-glucans and ß-1,6-glucans. These substances stimulate the immune system. ß-glucans also exhibit hypocholesterolemic and cancer prevention properties. Thailand had some commercially available edible mushrooms; thus, eight edible mushrooms were selected for screening of their ß-glucan content. It was found that ß-glucan contents in *Schizophylum commune* Fr., *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing, *Pleurotus osttreatus* (Fr.) Kummer, *Auricularia auricula* Judae, *Volvariella vovacea* (Bull., Ex, Fr.) Sing, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, *Flammulina velutipes* (Curt., Ex, Fr.) Sing and *Boletus griseipurpureus* Corner were 59.87%, 37.61%, 32.93%, 31.51%, 27.85%, 25.50%, 19.37% and 12.09%, respectively. Therefore *Auricularia auricula* Judae was selected to study the optimal conditions for extraction of ß-glucan. *Auricularia auricula* Judae has lowest cost of raw material per ß-glucan content (2.38 Bath/gram ß-glucan). It contained 6.00% of total dietary fiber (TDF), whereas soluble dietary fiber (SDF) was 5.57% and insoluble dietary fiber (IDF) was 0.46 %.

Extraction of ß -glucan from *Auricularia auricula* Judae was done at 121 °C and high pressure for 30, 45 and 90 minutes. The dried powder of *Auricularia auricula* Judae was pre-hydrolyzed by cellulase at 50 U/ml for 360 minutes, then the molecular weight distribution of ß-glucan was analyzed using High Perfomance Size Exclusion Chromatography (HPSEC). It was found that at temperature of 121 °C, at various times, the content (49.92%) and molecular weight of ß-glucans (10^4-10^5) Da were not significantly different. ($p>0.05$). When extraction temperature was increased to 130 °C, ß-glucans had molecular weight of 10^4-10^7 Da. Opitimal condition for extraction of ß-glucan was 130 °C for 30 minutes. The extract and sediment had ß-glucans of 9.08% and 36.59%, respectively.

ß-glucan was purified by removal of monosaccharides using ultrafiltration. The membranes with molecular weight cutoff (MWCO) of 5, 10 and 30 kDa, cross flow velocities (CFV) of 1 m/s and TMP of 1.5 bar using concentration mode. ß-glucan were analyzed by HPSEC. It was found that 30 kDa showed the best for removal of monosaccharides.

Results on study of ß-glucan on promoting of probiotics 2 strain (*Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (BB-12) and *Lactobacillus plantarum* TISTR 1465) cultivation on MRS plates at 37 °C in anaerobic jar for 48 h. It was found the ß-glucan from *Auricularia auricula* Judae could promote the growth of *L. plantarum* TISTR 1465 by increasing from 5.13×10^{6} to 2.37×10^{7} CFU/ml. Inulin showed the highest growth promotion of BB-12 by increase from 1.01×10^{8} to 3.73×10^{8} CFU/ml. ß-glucan from *Auricularia auricula* Judae showed slightly increase of BB-12 at 12 hr from 1.40×10^{8} to 1.49×10^{8} CFU/ml. It can be concluded that ß-glucan from *Auricularia auricula* Judae has specific growth promotion growth of *L. plantarum* TISTR 1465 more than BB-12. So that ß-glucan from *Auricularia auricula* Judae is candidate prebiotic.

Keywords : ß-glucan**,** *Auricularia auricula* Judae, prebiotic, probiotic

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติสำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ AGR560139S ในครั้งนี้ และขอบคุณนางสาวอัญชนา อำไพ นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรอาหารเพื่อสุขภาพและโภชนาการซึ่งเป็นผู้ช่วยวิจัยโครงการนี้จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อีกทั้งขอบคุณ รศ.ดร.วิโรจน์ ยูรวงศ์ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรสำหรับการอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์เมมเบรนรวมถึงการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีเมมเบรน

ผศ.ดร.สันทัด วิเชียรโชติ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย 2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม 3
2.1 เห็ด 3
2.1.1 พฤกษศาสตร์ของเห็ด 3
2.1.2 เห็ดหูหนูสีน้ำตาล 3
2.1.3 อุตสาหกรรมเห็ดของประเทศไทย 4
2.1.4 การใช้ประโยชน์ของเห็ด 4
2.2 พรีไบโอติก 6
2.2.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก 6
2.3 เบต้า-กลูแคน 7
2.3.1 แหล่งของเบต้า-กลูแคน 7
2.3.1.1 ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เล่ย์ 7
2.3.1.2 ยีสต์ 8
2.3.1.3 เห็ด 10
2.4 การสกัด แยกและทำบริสุทธิ์เบต้า-กลูแคน 11
2.4.1 เทคโนโลยีเมมเบรนและการทำบริสุทธิ์ 11
2.4.1.1 อัลตร้าฟิลเตรชัน (ultrafiltration: UF) 12
2.5 ผลต่อสุขภาพของเบต้า-กลูแคน 13
2.6 จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร 16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.1 แบคทีเรียแลคติก 17
2.6.2 ไบฟิโดแบคทีเรีย 17
2.7 ไอออนิคลิควิด 18
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 20
3.1 เตรียมตัวอย่างเห็ดที่ทำการคัดเลือก 20
3.2 การคัดเลือกชนิดของเห็ดที่มีปริมาณเบต้า-กลูแคนสูงสุด 20
3.3 การทำ Pre-treatment ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 20
3.4 ศึกษาเปรียบเทียบผลของวิธีสกัดต่อปริมาณเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้ 20
3.5 กรองแยกสารสกัดด้วยเมมเบรนชนิด Hollow fiber 21
3.6 การทดสอบเบต้า-กลูแคนที่แยกได้ต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 21
บทที่ 4 ผลการวิจัย 23
4.1 การคัดเลือกชนิดของเห็ดที่มีบริโภคได้ต่อปริมาณเบต้า-กลูแคนและต้นทุนวัตถุดิบ 23
4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณเบต้า-กลูแคนของเห็ดหูหนูสีน้ำตาล 24
4.3 การเปรียบวิธีสกัดเบต้า-กลูแคนออกจากเห็ดด้วยไออนลิควิดและการสกัดด้วยความร้อน ภายใต้ความดัน 25
4.4 การทำ Pre-treatment ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 26
4.5 การสกัดด้วยความร้อนภายใต้ความดัน 26
4.6 การทำให้บริสุทธิ์เบต้า-กลูแคน 31
4.7 การทดสอบเบต้า-กลูแคนที่แยกได้ต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 35
เอกสารอ้างอิง 36
ภาคผนวก 39
ประวัตินักวิจัย 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ปริมาณเบต้า-กลูแคน และราคาเห็ดชนิดต่างๆ....5
2.2 โครงสร้างอย่างง่ายของเบต้า-กลูแคนจากแหล่งต่างๆ....11
4.1 ปริมาณเบต้า-กลูแคน และต้นทุนต่อกรัมเบต้า-กลูแคนของเห็ดที่บริโภคได้ 8 ชนิด....23
4.2 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดหูหนูสีน้ำตาล....25
4.3 ขนาดโมเลกุลของเบต้า-กลูแคนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPSEC เมื่อสกัดที่ระดับอุณหภูมิ 121 °C ที่ระยะเวลาต่างๆ....30
4.4 ขนาดโมเลกุลของเบต้า-กลูแคนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPSEC เมื่อสกัดที่ระดับอุณหภูมิ 130 °C ที่ระยะเวลาต่างๆ....30
4.5 ปริมาณเบต้า-กลูแคนในกากและสารสกัดจากเห็ดหูหนูสีน้ำตาลหลังผ่านการสกัดด้วยความร้อนชื้นภายใต้ความดันที่สภาวะต่าง....31
4.6 ขนาดโมเลกุลของเบต้า-กลูแคนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPSEC เมื่อผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาดต่างๆ....33
4.7 แสดงการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1465 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ....34
4.8 แสดงการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ....35

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทางเคมีของ เบต้า-กลูแคน จากข้าวโอ๊ต....7
2.2 โครงสร้างเบต้า-กลูแคนจากยีสต์และเห็ด....9
2.3 ตำแหน่งของเบต้า-กลูแคนในผนังเซลล์ยีสต์....9
2.4 โครงสร้างเบต้า-กลูแคนจากธัญพืช (ก) และยีสต์ (ข)....10
2.5 ส่วนประกอบและระบบกรองระดับอัลตรา....13
2.6 กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้....14
2.7 กลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน....15
2.8 ตัวอย่างไอออนบวกที่ใช้ในการเตรียมไอออนิคลิควิด....18
2.9 ตัวอย่างไอออนลบที่ใช้ในการเตรียมไอออนิคลิควิด....19
2.10 การประยุกต์ใช้ไอออนิคลิควิด....19
4.1 การสกัดเห็ดด้วยไอออนลิควิด....25
4.2 ผลของความเข้มข้นเอนไซม์เซลลูเลสที่ระดับต่างๆ ต่อระดับการย่อยของเห็ดหูหนู....26
4.3 ผลการวิเคราะห์สารสกัดเห็ดหูหนู เมื่อสกัดที่ระดับอุณหภูมิ 121°C ที่ระยะเวลา 30(A), 45(B) และ 90(C) นาที ด้วยเครื่อง HPSEC....28
4.4 ผลการวิเคราะห์สารสกัดเห็ดหูหนู เมื่อสกัดที่ระดับอุณหภูมิ 130°C ที่ระยะเวลา 30(A), 45(B) และ 90(C) นาที ด้วยเครื่อง HPSEC....29
4.5 ผลการวิเคราะห์ส่วนที่ถูกกักกันโดยสารสกัดเห็ดหูหนู ผ่านเมมเบรนชนิดอัลตร้าขนาด MWCO 5(A), 10(B) และ 30(C) KDa ด้วยเครื่อง HPSEC....32