



การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่างๆ และการประยุกต์ใช้ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เพื่อยับยั้งการเกิดเมลานินซิส
ประภัสสร แสนธิ, จีรวรรณ มณีโรจน์ และเปรมวดี เทพวงศ์*

A study of the antioxidant activities and polyphenoloxidase inhibitory effects of several commercial mushroom trimming extracts and its application on inhibiting melanosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Prapathsorn Santhi, Jirawan Maneerote and Pramvadee Tepwong*

ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, 10900

* Corresponding author. E-mail address: ffispdt@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ดเป็นส่วนที่เกิดขึ้นจากการตัดแต่งและการล้างทำความสะอาดในขั้นตอนก่อนการจำหน่ายหรือการบริโภค รวมทั้งเห็ดที่ไม่ได้ขนาดตามที่ต้องการ ซึ่งส่วนเหลือดังกล่าวมักจะถูกทิ้งและไม่มีการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเต็มที่ ส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ดคาดว่าจะแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดออริจิล (*Pleurotus eryngii*) เห็ดชิเมจิดำ (*Hypsizygus tessellatus*) และเห็ดชิเมจิขาว (*Hypsizygus marmoreus*) โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (6.57 g GAE/100 g dry basis) ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ($EC_{50} = 1.93$) และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (% PPO inhibition = 20.3-43.7%) ดีที่สุด จึงเลือกมาศึกษาประสิทธิภาพในการชะลอการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยทำการแช่กุ้งขาวในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร)) เป็นเวลา 60 นาที ผลการศึกษาพบว่า กุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีค่าคะแนนการเกิดเมลานินซิสอยู่ในช่วงที่ผู้ทดสอบให้การยอมรับและมีค่าสีเทาลดลงต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่แช่ในน้ำกลั่นและแช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ($p \leq 0.05$) ดังนั้น สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีแนวโน้มเป็นวัตถุเจือปนอาหารทางเลือกจากธรรมชาติเพื่อชะลอการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวระหว่างการเก็บรักษา

คำสำคัญ: ส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ด สารต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส เมลานินซิส กุ้งขาว

Abstract

Mushroom trimming are inedible part and small size of whole mushroom, which is exhibited during sizing, trimming and cleaning process. They are agricultural waste and not being used to its advantage. Mushroom trimming may be enrich source of bioactive compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the antioxidative activities and polyphenoloxidase inhibitory effects of 70% ethanolic extracts from the trimming part of 5 mushroom species, namely black mushroom (*Lentinus edodes*), sajar-caju mushroom (*Pleurotus sajor-caju*), king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*), brown beech mushroom



(*Hypsizygus tessellatus*) and white beech mushroom (*Hypsizygus marmoreus*). The content of total phenolic compound (TPC), DPPH radical scavenging activity and inhibition of polyphenoloxidase of 5 mushroom trimming extracts were determined. The result showed that TPC, DPPH radical scavenging activity and inhibition of polyphenoloxidase of 5 mushroom trimming extracts were significant ($p \leq 0.05$). The black mushroom trimming extract (BMTE) had highest TPC (6.57g GAE/100 g dry basis), DPPH radical scavenging activity ($EC_{50} = 1.93$) and inhibition of polyphenoloxidase (% PPO inhibition = 20.3–43.7%). Thus, BMTE was selected to study the effect of melanosis formation in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The white shrimp were treated by immersed in BMTE solution at different concentrations (0.5, 1.0 1.5 and 2.0% (w/v)) for 60 min. It was found that shrimp treated with 1.5 and 2.0% (w/v) BMTE had the lower melanosis score and considered to be acceptable by the panelists. The decreased of mean gray values was more slowly in treated samples, compared with other treated samples ($p \leq 0.05$). This study indicated efficiency that BMTE was an alternative natural melanosis inhibitor for retardation of melanosis in shrimp during post-mortem storage.

Keywords: mushroom trimming extract, antioxidant activity, inhibition of polyphenoloxidase, melanosis, white shrimp

บทนำ

ปัจจุบันการเพาะปลูกและบริโภคเห็ดในประเทศไทยได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเห็ดมีราคาถูก หาได้ง่ายและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบไปด้วยสารอาหารหลายชนิด เช่น วิตามิน B1 (thiamin) วิตามิน B2 (riboflavin) และวิตามิน B3 (niacin) รวมทั้งแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนี้เห็ดยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ป้องกันมะเร็งและเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Ferreira, Vaz, Vasconcelos, & Martins, 2010) ลดคอเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือด (Jeong et al., 2010) รวมทั้งยังเป็นแหล่งของสาร secondary metabolites หลายชนิดที่มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลิก, สาร ergothioneine และแซคคาไรด์ เป็นต้น (Dubost, Oua, & Beelmanb, 2007) จากการตรวจเอกสารเบื้องต้นพบว่า สารสกัดจากส่วนที่บริโภคได้ของเห็ดมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลในผลไม้และชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อสัตว์ได้ (Jang, Sanada, Ushio, Tanaka, & Ohshima, 2002; Bao, Shinomiya, Ikeda, & Ohshima, 2009) ในขั้นตอนก่อนการจำหน่ายหรือการบริโภคเห็ดจะมีการตัดแต่งก้านดอกและบริเวณโคน รวมทั้งเห็ดที่ไม่ได้ขนาดทำให้มีส่วนเหลือเกิดขึ้น ซึ่งส่วนเหลือดังกล่าวมักจะถูกทิ้งและจะกลายเป็นแหล่งสะสมของโรค แมลงและศัตรูเห็ด ถ้ามีการจัดการหรือกำจัดอย่างไม่เหมาะสม จากสาเหตุดังกล่าวนี้ กวิจัยจึง

พยายามศึกษาการใช้ประโยชน์ของส่วนเหลือทิ้งจากการตัดแต่งเห็ด เช่น การประยุกต์ใช้เศษเหลือจากการตัดแต่งเห็ดนางฟ้าผสมในอาหารปลาสดเพื่อปรับปรุงคุณภาพเนื้อปลาสด (อรพินท์ จินตสถาพร และคนอื่นๆ, 2556) และการใช้เศษก้านเห็ดหอมในการเลี้ยงไก่ (Buwjoom & Yamauchi, 2005) เป็นต้น

กุ้งขาว หรือ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2557 มีปริมาณการส่งออกสินค้าจากกุ้งขาว 63,177 ตัน คิดเป็นมูลค่า 23,456 ล้านบาท (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่ากุ้งขาวมีระยะเวลาการเก็บรักษาอย่างจำกัดแม้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากการเกิดจุดดำ (black spots) หรือบางครั้งเรียกว่า เมลาโนซิส (melanosis) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วบริเวณส่วนหัวและรอยางค์ ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) ในกุ้งเกิดการออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลเป็นสารประกอบควิโนนและเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันได้สารประกอบสีน้ำตาลที่เป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน โดยทั่วไปอุตสาหกรรมส่งออกหรือการแปรรูปกุ้งจะมีการใช้สารสังเคราะห์ ได้แก่ สาร 4-hexylresorcinol และสารกลุ่มซัลไฟด์ เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ (SMS) เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PPO อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารในกลุ่มซัลไฟด์เป็นสารก่อภูมิแพ้ โดยกระตุ้นอาการหอบในผู้ป่วยโรคหอบหืด (Martinez-Alvarez, Lopez-Caballero, Gomez-Guillen, & Montero, 2009) ทำให้นักวิจัยเริ่มหันมาให้ความสนใจและทำการศึกษาการใช้สารทดแทนที่



มีสมบัติหรือมีประสิทธิภาพเทียบเท่าสารทางการค้ามากขึ้น สารสกัดจากธรรมชาติที่มีรายงานว่าสามารถชะลอหรือยับยั้งการเกิดเมลานินซิสในกุ้งได้ ได้แก่ สารสกัดจากส่วนที่บริโภคได้ของเห็ดเข็มทอง (Jang, Sanada, Ushio, Tanaka, & Ohshima, 2003) สารสกัดจากเมล็ดกระถิน (Nirmal & Benjakul, 2011) รวมทั้งสารสกัดจากเปลือกทับทิม (Fang, Sun, Huang, & Yuan, 2013) เป็นต้น

จากสมบัติด้านต่าง ๆ ของสารสกัดจากส่วนที่บริโภคได้ของเห็ดและความต้องการสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถชะลอการทำงานของเอนไซม์ PPO ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์ PPO ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่าง ๆ ที่นิยมบริโภคและหาได้ง่ายในประเทศไทย โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO รวมทั้งทำการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดในการยับยั้งการเกิดเมลานินซิสของกุ้งขาวที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยผลการศึกษาที่ได้นอกจากจะทำให้ทราบถึงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่าง ๆ และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชะลอการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวแล้ว ยังเป็นการช่วยลดปริมาณเศษเหลือทางการเกษตรอีกทางหนึ่งด้วย

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่างส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ด นำส่วนเหลือจากการตัดแต่งดอกและก้านเห็ดรวมทั้งเห็ดที่ไม่ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เห็ดหอม เห็ดออริโนจิ เห็ดนางฟ้า เห็ดชิเมจิดำและเห็ดชิเมจิขาว มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบ ลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นสุดท้ายร้อยละ 10 จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียด บรรจุใส่ถุงพอลิเอทิลีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. การเตรียมสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

นำตัวอย่างส่วนเหลือจากการตัดแต่งเห็ดแห้งมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยดัดแปลงวิธีการจาก Tepwong, Giri, Sasaki, Fukui, and Ohshima (2012) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้นำสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีระดับความเข้มข้นตามที่ต้องการ

3. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ดัดแปลงวิธีการจาก Slinkard & Singleton (1997) และทำการคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

3.2 การวิเคราะห์ค่า 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity โดยดัดแปลงวิธีการจาก Mau, Lin, and Chen (2002) และรายงานผลในรูปแบบของค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของสารละลาย DPPH ลดลง 50% ซึ่งสามารถคำนวณได้จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % radical scavenging activity

3.3 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ PPO ตามวิธีของ Nirmal and Benjakul (2009) มีวิธีการพอสังเขปคือ

3.3.1 การสกัด crude PPO จากส่วนหัวที่เชื่อมกับอกของกุ้ง (cephalothoraxes)

3.3.2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ PPO มีวิธีการทดลอง คือ นำ crude PPO ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย L-DOPA โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำปราศจากไอออน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที และนำไปคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ โดยหนึ่งหน่วยกิจกรรมเอนไซม์ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 ที่ 475 นาโนเมตร/ นาที/ มิลลิลิตร



3.3.3 การวิเคราะห์ค่าการยับยั้งกิจกรรม เอนไซม์ PPO มีวิธีการทดลองพอสังเขปคือ นำสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กรัม/ลิตร ผสมให้เข้ากันกับ crude PPO แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากันแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที และคำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ดังสมการ

$$\text{PPO inhibition (\%)} = (A-B/A) \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่สกัดได้จากส่วนหัวที่เชื่อมกับอกของกุ้ง (cephalothoraxes)

B คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

เมื่อ % PPO inhibition เพิ่มขึ้นแสดงว่าสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในกุ้งขาวเพิ่มขึ้น

4. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

นำกุ้งขาวขนาด 70-80 ตัว/กิโลกรัม ที่จับขึ้นจากบ่อเลี้ยงของเกษตรกรที่ผ่านมาตรฐาน Good Aquaculture Practice (GAP) ในอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร บรรจุลงในกล่องพอลิสไตรีน โดยเรียงกุ้งขาวสลับชั้นกับน้ำแข็งในอัตราส่วนกุ้งต่อน้ำแข็งเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) และขนส่งมายังภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายในระยะเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกุ้งขาวมาล้างด้วยน้ำเย็นและสะเด็ดน้ำและนำกุ้งขาวมาแช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นเวลา 60 นาที โดยมีชุดควบคุม คือน้ำกลั่นและสารละลาย SMS ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.25 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กำหนดให้อัตราส่วนกุ้งต่อสารละลายเท่ากับ 1:2 และควบคุมอุณหภูมิระหว่างการศึกษาไม่ให้เกิน 4 ± 1 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการสะเด็ดน้ำและบรรจุกุ้งขาวในถุงพอลิเอ

ทิลีนและเก็บรักษาในกล่องพอลิสไตรีนที่บรรจุน้ำแข็งในอัตราส่วนของกุ้งขาวต่อน้ำแข็งเท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) นำไปเก็บรักษาในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วันและเปลี่ยนน้ำแข็งทุกวัน จากนั้นทำการวิเคราะห์การเกิดเมลานินซิสและค่าสีเทา

4.1 การวิเคราะห์ค่าคะแนนการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาว (Melanosis score)

ทำการประเมินและให้คะแนนค่าการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวชุดควบคุมและกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 8 คนที่ผ่านการฝึกฝนให้คุ้นเคยกับการเปลี่ยนแปลงการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาว ตั้งแต่ไม่พบเมลานินซิสในกุ้งขาวจนถึงยอมรับไม่ได้ โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนตาม 10-point scoring ซึ่งดัดแปลงจาก Otwell and Marshall (1986)

4.2 การบันทึกภาพกุ้งขาวและการวิเคราะห์ค่าสีเทา (mean gray value)

ทำการบันทึกภาพกุ้งขาวชุดควบคุมและกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดด้วยกล้องดิจิทัลทุกวัน เพื่อติดตามการเกิดเมลานินซิส จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าสีเทาของตัวอย่างกุ้งขาว โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Image J โดยค่าสีเทาจะแปรผกผันกับการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาว เมื่อค่าสีเทาลดลงแสดงว่าเมลานินซิสในกุ้งขาวเพิ่มมากขึ้น

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ตลอด (Complete Randomized Design: CBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

1. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดจำนวน 5 ชนิด พบว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด



แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) โดยเห็ดออริโนจิมี่ปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (6.93 g GAE/100 g dry basis) รองลงมาคือ เห็ดหอม (6.57g GAE/100 g dry basis) เห็ดชิเมจิขาว (6.40 g GAE/100 g dry basis) เห็ดชิเมจิดำ (6.21 g GAE/100 g dry basis) และเห็ดนางฟ้า (5.96 g GAE/100 g dry basis) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (g GAE/100g dry basis)
เห็ดหอม (<i>Lentinus edodes</i>)	6.57 ± 0.008 ^b
เห็ดนางฟ้า (<i>Pleurotus sajor-caju</i>)	5.96 ± 0.010 ^c
เห็ดออริโนจิมี่ (<i>Pleurotus eryngii</i>)	6.93 ± 0.001 ^a
เห็ดชิเมจิขาว (<i>Hypsizygos marmoreus</i>)	6.40 ± 0.013 ^c
เห็ดชิเมจิดำ (<i>Hypsizygos tessellatus</i>)	6.21 ± 0.007 ^d

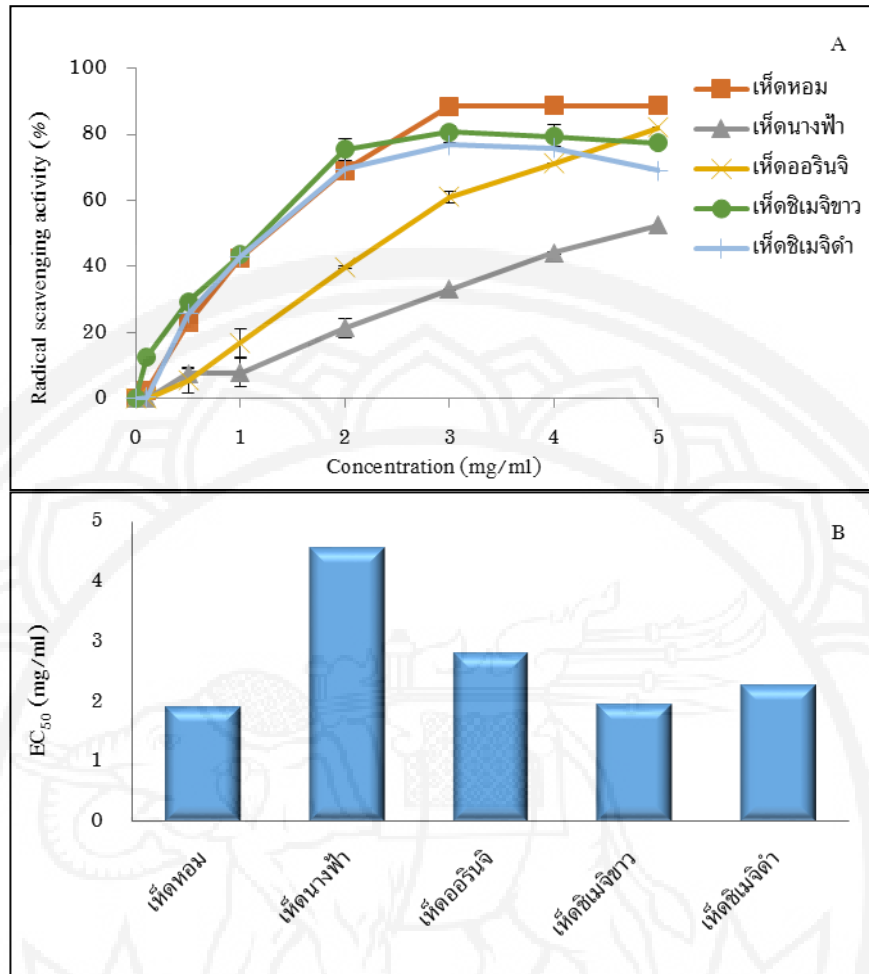
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่าง แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สาเหตุที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดมีค่าแตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการสร้างและการย่อยสลายของเห็ดชนิดนั้นๆ (Arbaayah & Umi, 2013) Bao, Osako, and Ohshima (2010) ได้ทำการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากส่วนที่บริโภคได้ของเห็ดจำนวน 10 ชนิด ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและสกัดครั้งที่สองด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ผลการศึกษาพบว่า เห็ดหอมและเห็ดชิเมจิดำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใกล้เคียงกันกับการศึกษาครั้งนี้ของคณะผู้วิจัย มีเพียงเห็ดออริโนจิมี่เท่านั้นที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจากส่วนของเห็ดที่ใช้ในการสกัด ขั้นตอนการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน รวมทั้งสถานที่ในการเพาะปลูกและระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าแตกต่างกัน

1.2 ค่า 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

ผลการศึกษาค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดที่ระดับความเข้มข้นช่วง 0.1 ถึง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดทั้ง 5 ชนิด มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันไปแต่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น โดยสารสกัดจากส่วนเหลือการตัดแต่งเห็ดหอมมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดี

ที่สุด (รูปที่ 1A) และเมื่อคำนวณหาค่า EC_{50} ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด พบว่า เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดออริโนจิมี่ เห็ดชิเมจิขาว และเห็ดชิเมจิดำ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.93 4.58 2.83 1.96 และ 2.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 1B) โดยสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีค่า EC_{50} น้อยที่สุด ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เนื่องจากใช้ปริมาณสารสกัดปริมาณน้อยที่สุดเพื่อทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเห็ดชิเมจิขาว เห็ดชิเมจิดำ เห็ดออริโนจิมี่ และเห็ดนางฟ้า ตามลำดับ Sudha, Vadivukkarasi, Shree, and Lakshmanan (2012) รายงานว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดอาจมีสารกลุ่ม active substances เช่น สารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถในการให้อนุมูลไฮโดรเจนในการทำปฏิกิริยากับ DPPH ซึ่งเป็นกลไกของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ Akanmu, Cecchini, Aruoma, and Halliwell (1991) ยังรายงานไว้ว่า สาร ergothioneine ซึ่งเป็น secondary metabolite product สามารถกำจัดอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) ($\cdot OH$) ซึ่งมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามาก และยังมีความสามารถในการจับกับ divalent metal ion ของ Cu^{2+} , Cd^{2+} และ Hg^{2+} (Motohashi, Mori, & Sugiura, 1976)

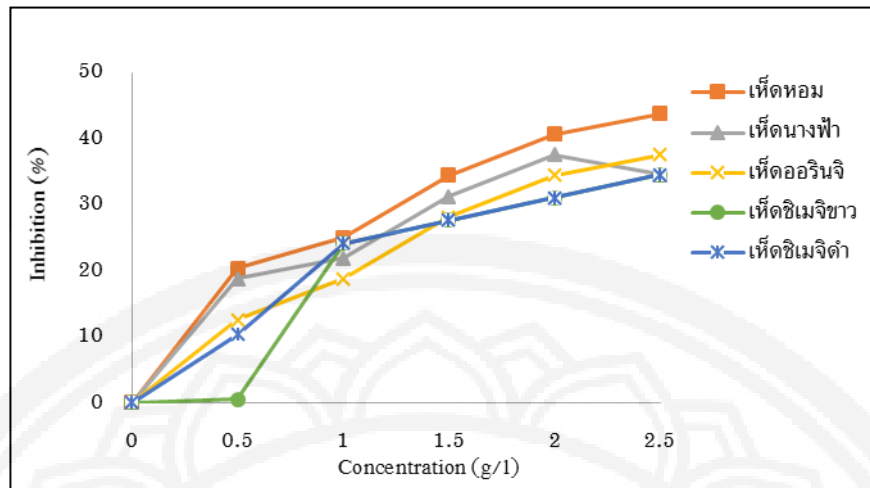


รูปที่ 1 ค่า DPPH radical scavenging activity (%) (A) และค่า EC₅₀ (B) ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่างๆ

1.3 ค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO (% PPO inhibition)

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PPO ที่แตกต่างกัน คือ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดเพิ่มขึ้น % PPO inhibition จะเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 2) โดยสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมี % PPO inhibition สูงสุด (20.3–43.7%) รองลงมาคือ เห็ดนางฟ้า (18.7–34.5%) เห็ดออริโนจิ (12.5–37.5%) เห็ดชิเมจิขาว (0.5–34.5%) และเห็ดชิเมจิดำ (10.3–34.5%) ตามลำดับ สาเหตุที่ % PPO inhibition แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลเนื่องจากสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดแต่ละชนิดประกอบไปด้วยสารประกอบบางอย่าง เช่น สารประกอบฟีนอลิกหรือสาร

ergothioneine ที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเข้าทำปฏิกิริยากับบริเวณ active site ของเอนไซม์ หรือทำปฏิกิริยากับโปรตีนหรือเอนไซม์ผ่านพันธะไฮโดรเจนหรืออันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ส่งผลให้เอนไซม์ PPO ในกุ่มอาจเกิดการรวมตัวหรือสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงาน (Nirmal & Benjaku, 2009) นอกจากนี้ สาร ergothioneine ซึ่งจัดเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) อาจเข้าจับกับเอนไซม์ PPO บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณ active site หรือทำหน้าที่กำจัด Cu^{2+} บริเวณ binding site ส่งผลให้เอนไซม์ PPO ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้น้อยลง (Park et al., 2006; Encarnacion, et al., 2012) ดังนั้น เมื่อเอนไซม์ PPO ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้น้อยลง % PPO inhibition จึงเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2 ค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่าง ๆ

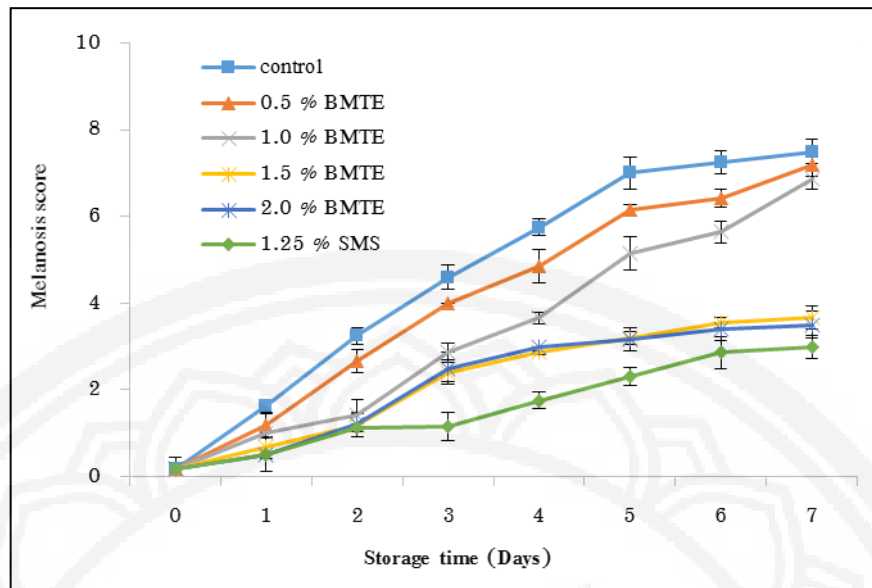
2. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด

จากการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารยับยั้งการเกิดเมลานินของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ด พบว่า สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีแนวโน้มในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งการเกิดเมลานินสูงที่สุด โดยพิจารณาจากปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด, ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงคัดเลือกสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอม เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชะลอการเกิดเมลานินในกุ้งขาว

2.1 ค่าคะแนนการเกิดเมลานิน

จากการวิเคราะห์ค่าคะแนนการเกิดเมลานินโดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน (รูปที่ 3) พบว่า ค่าคะแนนการเกิดเมลานินในกุ้งขาวมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การเกิดเมลานินจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องไปเรื่อยๆ โดยกุ้งขาวที่แช่น้ำกลั่นมีระดับการเกิดเมลานินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ค่าคะแนนการเกิดเมลานินสูงกว่ากุ้งขาวในชุดการทดลองอื่นๆ โดยจะสังเกตเห็นเมลานินได้ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาและในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาพบว่า ค่าคะแนนการเกิดเมลานินสูงมากกว่า 5 ซึ่งแสดงว่าผู้ทดสอบไม่ยอมรับตัวอย่างส่วนกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ระดับความเข้มข้นที่

เพิ่มขึ้นจะแปรผกผันกับค่าคะแนนการเกิดเมลานิน กล่าวคือ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมเพิ่มขึ้น ค่าคะแนนการเกิดเมลานินในกุ้งจะต่ำลง โดยกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะเกิดเมลานินค่อนข้างไวและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ค่าคะแนนจากผู้ประเมินมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยจะสังเกตเห็นเมลานินได้ในวันที่ 2 และ 3 ของการเก็บรักษาตามลำดับ และผู้ทดสอบยอมรับตัวอย่างจนถึงวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ในขณะที่กุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะสังเกตเห็นเมลานินได้ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ส่งผลให้ค่าคะแนนการเกิดเมลานินต่ำกว่ากุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.0 และ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกุ้งขาวที่แช่ในน้ำกลั่นตามลำดับ ($p < 0.05$) และยังสามารถชะลอการเกิดเมลานินได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกับกุ้งขาวที่แช่ในสารละลาย SMS ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.25 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ($p \geq 0.05$) นอกจากนี้ผู้ทดสอบยังยอมรับตัวอย่างตลอดระยะเวลาเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 7 วัน

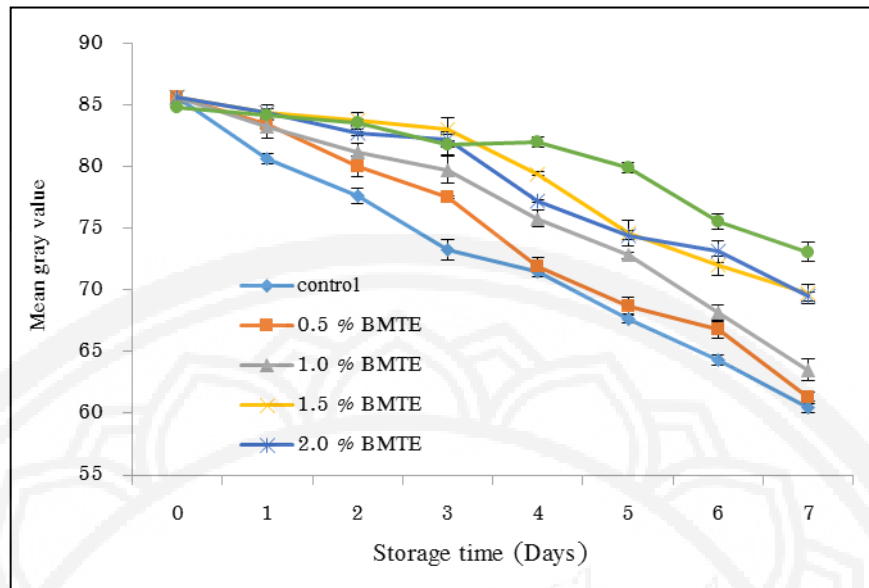


รูปที่ 3 คะแนนการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เมื่อ 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % BMTE : สารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร); control: น้ำกลั่น; 1.25 % SMS : สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.25 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

2.2 คำศัพท์

คำศัพท์เป็นคำที่ใช้สำหรับวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ได้จากการบันทึกภาพในแต่ละวันและนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (รูปที่ 4) ผลการศึกษาพบว่า ในวันแรกของการเก็บรักษาค่าสีเทาจะมีค่าสูงที่สุด เนื่องจากยังไม่พบการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาว แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นค่าสีเทาในกุ้งขาวชุดควบคุมและกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมจะลดลงเนื่องจากระดับการเกิดเมลานโนซิสเพิ่มขึ้น โดยกุ้งขาวที่แช่ในน้ำกลั่น และกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีค่าสีเทาลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่กุ้งขาวที่แช่ในสารละลาย SMS ที่ระดับความ

เข้มข้นร้อยละ 1.25 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีค่าสีเทาลดลงอย่างช้า ๆ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับค่าคะแนนการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาวที่ได้จากผู้ประเมิน คือ เมื่อค่าคะแนนการเกิดเมลานโนซิสเพิ่มขึ้นค่าสีเทาจะลดลง Bao (2014) ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดจากเห็ดฟางต่อการชะลอการเกิดเมลานโนซิสในกุ้งขาว โดยพบว่า สารสกัดจากเห็ดฟางที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถชะลอการเกิดเมลานโนซิสและมีการลดลงของค่าสีเทาช้ากว่า เมื่อเทียบกับกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากเห็ดฟางที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.75, 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และน้ำกลั่น ตามลำดับตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4 ค่าสีเทา (mean gray value) ของกุ้งขาวที่แช่ในสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอม (คำบรรยายตามรูปที่ 3)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO โดยศึกษาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในสาร สกัดจากการตัดแต่งเห็ดชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดจาก การตัดแต่งเห็ดแต่ละชนิดมีสมบัติในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยสารสกัด จากการตัดแต่งเห็ดหอมมีสมบัติในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PPO ดีที่สุด และที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของสารสกัดจากการตัดแต่งเห็ดหอมมีประสิทธิภาพใน การชะลอการเกิดเมลานินซิสในกุ้งขาวตลอดระยะเวลา การเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 7 วัน ได้ดีกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่แช่ในน้ำกลั่นซึ่งเกิดเมลานินซิสใน วันที่ 4 ของการเก็บรักษา ($p \leq 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2557). สถิติการส่งออก (Export) กุ้งขาว: ปริมาณและมูลค่าการส่งออกราย เดือน. สืบค้นจาก http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php [1]

อรพินท์ จินตสถาพร, จุฑามาศ ทะแกลัวพันธุ์, อรทัย จินตสถาพร, ศรีน้อย ชุ่มคำ, ฉัตรชัย ไทยทุ่งฉิน, และ สาธิต บุญน้อม. (2556). การปรับปรุงคุณภาพเนื้อ ปลาสลิดด้วยของเหลือจากการตัดแต่งเห็ดนางฟ้าใน อาหารปลา. *วารสารการพัฒนารวมชนและคุณภาพชีวิต*, 1(1), 125-133. [2]

Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I., & Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys*, 288, 10-16.

Arbaayah, H. H., & Umi, K. Y. (2013). Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom



- (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere*, 4(4), 661–673.
- Bao, H. N. D. (2014). Antioxidant activity of hydrophylic extract from straw mushroom and its effect on shrimp melanosis. *Khon Kean Agr. J.*, 42(4), 79–83.
- Bao, H. N. D., Osako, K., & Ohshima, T. (2010). Value-added use of mushroom ergothioneine as a colour stabilizer in processed fish meats. *Sci. Food Agric.*, 90, 1634–1641.
- Bao, H. N. D., Shinomiya, Y., Ikeda, H., & Ohshima, T. (2009). Preventing discoloration and lipid oxidation in dark muscle of yellowtail by feeding an extract prepared from mushroom (*Flammulina velutipes*) cultured medium. *Aquaculture*, 295, 243–249.
- Buwjoom, T., & Yamauchi, K. (2005). Effects of shitake mushroom stalk meal on growth performance, carcass yield and blood composition in broilers. *J. Poult Sci.*, 42, 283–290.
- Dubost, N. J., Oua, B., & Beelmanb, R. B. (2007). Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chem.*, 105, 727–735.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Jintasataporn, O., Worawattanamateekul, W., Hirono, I., & Ohshima, T. (2012). Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Food Res. Int.*, 45, 232–237.
- Fang, X. B., Sun, H. Y., Huang, B. Y., & Yuan, G. F. (2013). Effect of pomegranate peel extract on the melanosis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *J. Food Agric. Environ.*, 11, 105–109.
- Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. A., & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agent. Me.*, 10, 424–436.
- Jang, M. S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., & Ohshima, T. (2003). Inhibitory effect of enokitake extract on melanosis of shrimp. *Fisheries Sci.*, 69, 379–384.
- Jang, M. S., Sanada, A., Ushio, H., Tanaka, M., & Ohshima, T. (2002). Inhibitory effect of ‘enokitake’ mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *Lebns. Wiss. Technol.*, 35, 697–702.
- Jeong, S. C., Jeong, Y. T., Yang, B. K., Islam, R., Koyyalamudi, S. R., & Pang, G., ... Song, C. H. (2010). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, 30, 49–56.
- Martinez-Alvarez, O., Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C., & Montero, P. (2009). The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater oink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with different melanosis inhibiting formulars. *LWT-Food Sci. Technol.*, 42, 1335–1344.



- Mau, J. L., Lin, H. C., & Chen, C. C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J. Agr. Food Chem.*, *50*, 6072–6077.
- Motohashi, N., Mori, I., & Sugiura, Y. (1976). Complexing of copper ion by ergothioneine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *24*, 2364–2368.
- Nirmal, N. P., & Benjakul, S. (2009). Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chem.*, *116*, 323–331.
- Nirmal, N. P., & Benjakul, S. (2011). Inhibition of melanosis formation in Pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed. *Food Chem.*, *128*, 427–432.
- Otwell, W. S., & Marshall, M. R. (1986). Screening alternatives to sulfiting agents to control shrimp melanosis (blackspot). Retrieved from http://fshn.ifas.ufl.edu/seafood/sst/AnnPdf/11th_035.pdf
- Park, Y., Lyou, Y., Hahn, H., Hahn, M., & Yang, J. (2006). Complex inhibition of tyrosinase by thiol-composed Cu²⁺ chelators: A clue for designing whitening agents. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, *24*, 131–137.
- Slinkkard, K., & Singleton, V. L. (1997). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.*, *28*, 49–55.
- Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Shree, R. B. I., & Lakshmanan, P. (2012). Antioxidant Activity of Various Extracts from an Edible Mushroom *Pleurotus eous*. *Food Sci. Biotechnol.*, *21*(3), 661–668.
- Tepwong, P., Giri, A., Sasaki, F., Fukui, R., & Ohshima, T. (2012). Mycobial enhancement of ergothioneine by submerged cultivation of edible mushroom mycelia and its application as an antioxidative compound. *Food Chem.*, *131*, 247–258.

Translated Thai Reference

Jintasataporn, O., Thaklaewphan, C., Jintasataporn, O., Chumkam, S., Thaituchin, C. & Boonnom, S. (2013). Improving fillet quality of snakeskin Gourami (*Trichogaster pectoralis*) by supplemental sarjor-caju mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) by-product in fish diets. *J. Commun. Dev. Life Qual.*, *1*(1), 125–133. [in Thai] [2]

Ministry of Agriculture and Cooperatives. (2014). Statistics on white shrimp export: the quantity and value of export by monthly Retrieved from http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php [in Thai] [1]