

ผลของสารกระตุ้นต่อการผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Effects of elicitors on adenosine and cordycepin production of *Cordyceps militaris*

อนุกุล คมแก้ว¹ กาญจน์ คัมทรัพย์¹ เสาวภา ชูมณี¹ และ นุชจรี สิงห์พันธ์^{2*}
Anukun Komkaew¹, Kan Khoomsab¹, Saowapa Chumanee¹
and Nootjaree Singphan^{2*}

Received: 19 October 2022

Revised: 4 January 2023

Accepted: 25 January 2023

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารกระตุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อการเจริญของเส้นใย การเกิดดอก ลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ด และการผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มี 9 สิ่งทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร และสารละลายเมทิลจัสโมเนต 50 100 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ และไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) พบว่าการเจริญของเส้นใยทุกสิ่งทดลองให้น้ำหนักสดของเส้นใยและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่เส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Modified of Potato Dextrose Broth (MPDB) MPDB 3 ที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงกว่าสิ่งทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร Artificial Modified of Potato Dextrose Broth (A-MPDB) A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้จำนวนดอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อนำดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่า ดอกเห็ดมีค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดง (a^*) ค่าสีเหลือง (b^*) และค่า Hue angle เฉลี่ยเท่ากับ 70.46 ± 2.00 18.29 ± 0.52 49.59 ± 1.56 และ 69.75 ± 0.41 ตามลำดับ ในการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณอะดีโนซีนสูงสุด 47.73 ± 6.78 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 7 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณคอร์ไดเซปินสูงสุด 326.45 ± 34.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

คำสำคัญ: เห็ดถั่งเช่าสีทอง สารกระตุ้น อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

² Department of Science Education, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000

² สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

² Department of Agricultural Science, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000

*ผู้รับผิดชอบงาน (Corresponding author) e-mail: nootjaree.tud@pcru.ac.th

ABSTRACT

The purpose of this research was to observe the effects of different concentrations of elicitors on mycelial growth, fruiting body formation, physical feature and production of adenosine and cordycepin of *Cordyceps militaris*. The experimental design was Completely Randomized Design (CRD). There were 9 treatments with 3 replications including yeast extract at concentrations of 5 10 15 and 20 g/l and methyl jasmonate solution at concentrations of 50 100 150 and 200 μ M and control. Results showed that the mycelial fresh weight and the percentage of dry weight were not significantly different ($p>0.05$). Whereas, the mycelium which was cultured on the Modified of Potato Dextrose Broth (MPDB) MPDB 3 medium supplemented with 10 g/l yeast extract gave significant higher yield than other treatments in dry weight ($p<0.05$). The fruiting body numbers, fresh weight and dry weight of the fungi grown on the Artificial Modified of Potato Dextrose Broth (A-MPDB) A-MPDB 6 medium supplemented with 50 μ M methyl jasmonate solution gave the highest value ($p<0.01$). The mean values of brightness (L^*), red (a^*), yellow (b^*) and Hue angle of fruiting body cultured on the A-MPDB 6 medium gave 70.46 ± 2.00 , 18.29 ± 0.52 , 49.59 ± 1.56 and 69.75 ± 0.41 , respectively. The bioactive analysis revealed that the A-MPDB 6 medium gave the highest adenosine content of 47.73 ± 6.78 mg/100 g and that of A-MPDB 7 medium supplemented with 100 μ M methyl jasmonate solution gave the highest cordycepin content of 326.45 ± 34.28 mg/100 g.

Keywords: *Cordyceps militaris*; Elicitors; Adenosine; Cordycepin

บทนำ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเชื้อราปรสิตภายในแมลง (Entomopathogenic fungus) จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes[1] พบในแถบทวีปเอเชีย เช่น จีน ที่ราบสูงทิเบต อีกทั้งยังพบได้ในทวีปอเมริกาเหนือและทวีปยุโรป[2] เห็ดถั่งเช่าประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ที่สำคัญหลายชนิด แต่ในการวัดคุณภาพส่วนใหญ่จะวัดจากปริมาณของสารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์เป็นหลัก เช่น สารอะดีโนซีน (Adenosine) เป็นสารที่ช่วยป้องกันและรักษาภาวะโรคหัวใจล้มเหลว[3] ช่วยต้านการอักเสบ[4] และต้านเบาหวาน[5] ส่วนสารคอร์โดเซปิน (Cordycepin) มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มพลังภายในร่างกาย มีคุณสมบัติบำรุงไตและปอด[6] ช่วยต้านอนุมูลอิสระ[7] ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย[8] ช่วยในการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง[9] ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา[10] ด้านการเกิดเนื้องอก[11] ช่วยต้านมะเร็ง[12-13] ช่วยลดการอักเสบ[14] และเชื่อว่ามีสรรพคุณที่ช่วยเพิ่มสมรรถนะทางเพศได้[15] จากสรรพคุณดังกล่าวทำให้ผู้บริโภคต้องการบริโภคเห็ดถั่งเช่าสีทองเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะกลุ่มคนรักสุขภาพ

ในปัจจุบันผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อพบว่าให้ผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับต่ำซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ สภาพการเพาะเลี้ยงและสูตรอาหาร[16] ดังนั้นเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเข้ามามีบทบาทในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อควบคุมคุณภาพปริมาณการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชให้คงที่และมีปริมาณเพียงพอกับความต้องการของตลาด[17] รวมถึงเพื่อให้ผลผลิตและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการผลิตสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถเติมสารกระตุ้นบางชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในพืชได้ โดยเมทิลจัสโมเนต (Methyl jasmonate; MeJA) และสารสกัดยีสต์ (Yeast extract; YE) เป็นสารกระตุ้นที่นิยมนำมาใช้และประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.)[18] หนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.)[19] (*Panax ginseng*) [20] และหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill)[21] เป็นต้น เมทิลจัสโมเนตเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของจัสโมเนต (Jasmonate) สังเคราะห์มาจากกรดลิโนเลนิก จัดเป็นสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และนอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานให้กับพืชเพื่อตอบสนองต่อสิ่งรบกวนจากภายนอก เช่น บาดแผล การเข้าทำลายของโรคพืชและแมลง ตลอดจนความเครียด

ต่าง[22] สำหรับสารสกัดยีสต์ เป็นสารกระตุ้นการตอบสนองของพืชโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์พืช รวมถึงการสะสมสารทุติยภูมิในพืช[23]

อย่างไรก็ตามการใช้สารกระตุ้นจะเป็นกลยุทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสะสมสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพร แต่ยังไม่พบการรายงานการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้สารสกัดยีสต์และสารละลายเมทิลจัสโมเนตเพื่อเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งระดับความเข้มข้นของสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิด เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองของพืชเพื่อเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของสารกระตุ้นและระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันต่อการเจริญเติบโต และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย คุณลักษณะทางกายภาพและผลผลิตที่ได้ และวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทอง เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดสำหรับผู้ประกอบการและผู้สนใจในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการวิจัย

1.1 นำเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง (Potato Dextrose Agar; PDA) มาทำการขยายเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนหัวเชื้อโดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย 1x1 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง (Modified of Potato Dextrose Broth; MPDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยสูตรอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร เติมน้ำสะอาดปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดกรองผ่านตะแกรงเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำสกัด จากนั้นเติมกลูโคส 20 กรัม สารสกัดยีสต์ 15 กรัม เปปโตน 15 กรัม หนอนไหม (ตราแม่อุไร) บดละเอียด 30 กรัม วิตามินบี 1 0.2 กรัม และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำสกัดมันฝรั่งต้ม (ข้อ 1.1) ปรับปริมาตรด้วยน้ำสะอาดให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.5-7.0 จากนั้นนำไปหมักในที่มีดบนเครื่องเขย่า (Shaker) ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

1.2 ทำการถ่ายเชื้อเห็ดลงบนอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง (Artificial of Potato Dextrose Broth; A-MPDB) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อการสร้างดอก (Stroma) โดยสูตรอาหารเทียมประกอบด้วย เมล็ดข้าวกล้องหอมมะลิ 30 กรัมต่อขวด ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อขวด ที่ประกอบด้วย กลูโคส 5 กรัม ซูโครส 15 กรัม สารสกัดยีสต์ 5 กรัม เปปโตน 5 กรัม หนอนไหม 30 กรัม วิตามินบี 1 0.2 กรัม และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำสกัดมันฝรั่งต้ม (ข้อ 1.1) ปรับปริมาตรด้วยน้ำสะอาดให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.5-7.0 จากนั้นนำไปหมักในที่มีด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน จนมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารเทียม จากนั้นกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกเห็ดโดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 600-1,000 ลักซ์ วันละ 16 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 60 วัน จนกระทั่งได้ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สมบูรณ์ ทำการคัดเลือกดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง PDA นำดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่คัดเลือก มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม และ ผงวุ้นบริสุทธิ์ (ตรานางเจ๊ก) 15 กรัม ละลายในน้ำสกัดมันฝรั่งต้ม (ข้อ 1.1) ปรับปริมาตรด้วยน้ำสะอาดให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.5-7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้เย็น ใช้มีดตัดส่วนก้าน (Fruiting body) ของดอกเห็ดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเอาชิ้นส่วนของดอกเห็ดวางลงบนอาหารแข็ง PDA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปหมักในที่มีดในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB

นำเชื้อเห็ดถังเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA เป็นระยะเวลา 14 วัน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารหัวเชื้อเหลว สูตรดัดแปลง MPDB ที่เติมสารกระตุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน สิ่งทดลองประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ (HimediaTM, India) 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร และสารละลายเมทิลจัสโมเนต (Sigma-aldrich, USA) 50 100 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ และไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มี 9 สิ่งทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ โดยอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม เปปโตน 15 กรัม หนอนไหม 30 กรัม วิตามินบี1 0.2 กรัม และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำสกัดมันฝรั่งต้ม (ข้อ 1.1) ปรับปริมาตรด้วยน้ำสะอาดให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.5-7.0 บรรจุใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตรต่อขวด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ที่เจาะลูกคอร์ก (Cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อเจาะบริเวณรอบนอกโคโลนีให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยจำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงบนอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB สูตรต่างๆ นำไปบ่มในที่มืดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารหัวเชื้อเหลวที่มีการเจริญของเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยระบบปั๊มสุญญากาศ (Sparmax, 1/8 Single Cylinder, Taiwan) แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง รวบรวมกระดาษกรองไม่มีน้ำหยด [24] แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโตของเส้นใยของเห็ดถังเช่าสีทองดังนี้ 1) บันทึกน้ำหนักสด 2) บันทึกน้ำหนักแห้ง (น้ำหนักที่ผ่านการกรองมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง) และ 3) หาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเส้นใย

3. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองบนอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB

ทำการเตรียมอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB ที่เติมสารกระตุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน สิ่งทดลองประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ (HimediaTM, India) 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร และสารละลายเมทิลจัสโมเนต (Sigma-aldrich, USA) 50 100 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ และไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด โดยอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB ประกอบด้วย กลูโคส 5 กรัม ซูโครส 15 กรัม เปปโตน 5 กรัม หนอนไหม 30 กรัม วิตามินบี1 0.2 กรัม และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำสกัดมันฝรั่งต้ม (ข้อ 1.1) ปรับปริมาตรด้วยน้ำสะอาดให้ได้ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 6.5-7.0 จากนั้นเติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB ที่เติมสารกระตุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อขวด ลงบนอาหารเทียมที่เติมเมล็ดข้าวกล้องหอมมะลิ 30 กรัมต่อขวด ที่บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นถ่ายเชื้อเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB ที่เติมสารกระตุ้นที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน เป็นระยะเวลา 7 วัน ลงบนอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 14 วัน จนมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารเทียม จากนั้นกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกเห็ดโดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ให้แสง 600-1,000 ลักซ์ วันละ 16 ชั่วโมง จนกระทั่งมีตุ่มดอกเห็ดเกิดขึ้น เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโตดังนี้ 1) นับจำนวนดอกทั้งหมด 2) น้ำหนักสดของดอก 3) น้ำหนักแห้งของดอก (อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง) 4) หาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของดอก และ 5) วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Spectrophotometer, Hunter Lab, Mini Sean E2 4500 L, USA) แสดงค่าความสว่างด้วยค่า L^* , ค่าสีแดง แสดงด้วยค่า a^* ค่าสีเหลือง แสดงด้วยค่า b^* และค่า Hue angle

4. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินในดอกเห็ดถังเช่าสีทองอบแห้งที่เจริญบนอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB สูตรต่างๆ หลังจากการเก็บเกี่ยว เริ่มจากสกัดสารจากดอกเห็ดถังเช่าสีทอง (Crude extract) เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปิน ซึ่งดัดแปลงมาจาก Zeng, et al.[25] จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปิน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ยี่ห้อ Agilent 1260 คอลัมน์ YMC-Triart C18 (ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมโครเมตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) อัตราส่วนคงที่คือ น้ำกับเมทานอล (83:17 %v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณ Diode Array Detector (DAD)

ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 260 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในตัวอย่าง ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองบนอาหารหัวเชื้อเหลวสูตรดัดแปลง MPDB

พบว่าน้ำหนักสดของเส้นใยของเห็ดถังเช่าสีทองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อนำน้ำหนักแห้งของเส้นใย พบว่าเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MPDB 3 ที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักแห้งของเส้นใยมากที่สุดเท่ากับ 1.89 ± 0.24 กรัมต่อขวด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยน้อยที่สุดเท่ากับ 1.59 ± 0.11 กรัมต่อขวด จากการนำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใยมาหาค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของสารกระตุ้นต่อน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของเส้นใยของเห็ดถังเช่าสีทอง

สูตร	YE (g/l)	MeJA (μ M)	Mycelium		เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง (%)
			น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	
MPDB 1	0		5.95 ± 1.30	1.67 ± 0.22^{ab}	28.53 ± 3.73
MPDB 2	5		8.79 ± 3.75	1.73 ± 0.24^{ab}	22.12 ± 9.56
MPDB 3	10		8.43 ± 2.77	1.89 ± 0.24^a	23.60 ± 5.33
MPDB 4	15		7.86 ± 3.52	1.70 ± 0.11^{ab}	24.26 ± 9.06
MPDB 5	20		6.13 ± 0.28	1.65 ± 0.06^{ab}	26.98 ± 2.20
MPDB 6		50	7.21 ± 1.49	1.59 ± 0.11^b	22.62 ± 5.20
MPDB 7		100	5.69 ± 0.32	1.64 ± 0.10^{ab}	28.88 ± 3.17
MPDB 8		150	6.65 ± 0.66	1.65 ± 0.67^{ab}	24.87 ± 2.68
MPDB 9		200	7.38 ± 1.12	1.66 ± 0.07^{ab}	22.81 ± 2.68
F-test			ns	*	ns
CV%			62.22	1.18	21.64

หมายเหตุ: *=Significant difference at $P<0.05$, ns=Non-Significant, MPDB=Modified of potato dextrose broth, YE=Yeast extract, MeJA=Methyl jasmonate

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถังเช่าสีทองบนอาหารเทียมที่เติมอาหารเหลวเทียมสูตรดัดแปลง A-MPDB

พบว่าจำนวนดอก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนดอก 55.93 ± 10.65 ดอกต่อขวด น้ำหนักสดดอกเห็ด 5.84 ± 0.73 กรัมต่อขวด และน้ำหนักแห้งดอกเห็ดน้อยที่สุดเท่ากับ 1.25 ± 0.19 กรัมต่อขวด ตามลำดับ ในขณะที่ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 4 ที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร มีจำนวนดอก 9.37 ± 4.55 ดอกต่อขวด น้ำหนักสดดอกเห็ด 2.02 ± 0.85 กรัมต่อขวด และน้ำหนักแห้ง

ดอกเห็ดที่น้อยที่สุดเท่ากับ 0.44 ± 0.19 กรัมต่อขวด ตามลำดับ จากการนำค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดมาหาค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีความสว่าง (L^*) มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 70.46 ± 2.00 ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 3 ที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มีความสว่าง (L^*) น้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 60.74 ± 8.00 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการวัดค่าสีแดง (a^*) พบว่า ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 1 ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) มีค่าสีแดง (a^*) มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 25.79 ± 1.72 ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีค่าสีแดง (a^*) น้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 18.29 ± 0.52 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) สำหรับค่าสีเหลือง (b^*) พบว่า ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 1 ไม่เติมสารกระตุ้น (สิ่งทดลองควบคุม) มีค่าสีเหลือง (b^*) มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 55.58 ± 0.78 ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีค่าสีเหลือง (b^*) น้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 49.59 ± 1.56 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และเมื่อตรวจหาค่าเฉดสี Hue angle พบว่า ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ให้ค่าเฉดสี Hue angle มากที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 69.75 ± 0.41 ส่วนดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 4 ที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉดสี Hue angle น้อยที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ย 64.73 ± 0.83 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) (ตารางที่ 2)

3. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

พบว่าดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 6 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงที่สุดเท่ากับ 47.73 ± 6.78 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 9 ที่เติมสารละลายเติมเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณสารอะดีโนซีนน้อยที่สุดเท่ากับ 18.65 ± 1.71 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินนั้น พบว่า ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 7 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงที่สุดเท่ากับ 326.45 ± 34.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร A-MPDB 8 ที่เติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 150 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณสารคอร์ไดเซปินน้อยที่สุดเท่ากับ 239.00 ± 24.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ผลของสารกระตุ้นต่อจำนวนดอก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และค่าสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สูตร	YE (g/l)	MeJA (μM)	Fruiting body				Color			
			จำนวนดอก	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง (%)	L*	a*	b*	Hue angle
A-MPDB 1	0		18.90±2.52 ^{bc}	4.02±0.64 ^{bc}	0.92±0.00 ^{ab}	23.16±4.03	63.40±1.95 ^{bc}	25.79±1.72 ^a	55.58±0.78 ^a	65.11±1.67 ^c
A-MPDB 2	5		19.30±8.14 ^{bc}	4.49±1.19 ^b	0.93±0.36 ^{ab}	20.32±3.05	65.97±1.25 ^{abc}	22.89±2.21 ^{ab}	54.88±2.13 ^a	67.40±1.33 ^b
A-MPDB 3	10		21.67±7.09 ^b	3.80±1.08 ^{bcd}	0.84±0.20 ^b	22.53±1.92	60.74±8.00 ^c	21.10±2.09 ^b	50.46±5.19 ^{bc}	67.31±0.12 ^b
A-MPDB 4	15		9.37±4.55 ^c	2.02±0.85 ^e	0.44±0.19 ^c	21.93±1.16	64.00±1.63 ^{bc}	25.50±1.02 ^a	54.00±0.56 ^{ab}	64.73±0.83 ^c
A-MPDB 5	20		12.60±1.57 ^{bc}	2.76±0.49 ^{cde}	0.58±0.13 ^{bc}	20.86±1.14	65.99±1.78 ^{abc}	23.45±2.34 ^{ab}	53.52±1.08 ^{abc}	66.38±1.67 ^{bc}
A-MPDB 6		50	55.93±10.65 ^a	5.84±0.73 ^a	1.25±0.19 ^a	21.32±0.50	70.46±2.00 ^a	18.29±0.52 ^c	49.59±1.56 ^c	69.75±0.41 ^a
A-MPDB 7		100	19.80±2.13 ^b	3.29±0.87 ^{bcd}	0.73±0.20 ^{bc}	21.76±0.46	68.82±1.74 ^{ab}	21.77±1.14 ^b	53.63±0.75 ^{ab}	67.91±1.19 ^{ab}
A-MPDB 8		150	20.77±0.64 ^b	2.50±0.17 ^{de}	0.60±0.05 ^{bc}	24.01±0.56	67.13±0.75 ^{ab}	23.78±1.11 ^{ab}	53.35±1.53 ^{abc}	65.97±0.84 ^{bc}
A-MPDB 9		200	21.13±19.01 ^b	3.04±0.21 ^{cde}	0.69±0.04 ^{bc}	22.87±1.35	67.30±0.22 ^{ab}	22.96±0.45 ^{ab}	54.53±1.37 ^a	67.17±0.38 ^b
F-test			**	**	**	ns	*	**	*	**
CV%			24.63	21.81	23.40	4.70	4.60	6.80	3.98	1.61

หมายเหตุ: * = Significant difference at P<0.05, ** = Significant difference at P<0.01, ns = Non-Significant, A-MPDB = Artificial of potato dextrose broth, YE = Yeast extract, MeJA = Methyl jasmonat

ตารางที่ 3 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินของดอกเห็ดถึงเข้าสู่สีทอง

สูตร	YE (g/l)	MeJA (μ M)	Bioactive compounds	
			Adenosine (mg/100g)	Cordycepin (mg/100g)
A-MPDB 1	0		37.92 $\pm$ 4.78 ^b	314.29 $\pm$ 52.31 ^{ab}
A-MPDB 2	5		39.38 $\pm$ 2.50 ^b	303.57 $\pm$ 30.12 ^{ab}
A-MPDB 3	10		28.18 $\pm$ 4.44 ^{cd}	300.35 $\pm$ 34.50 ^{ab}
A-MPDB 4	15		32.58 $\pm$ 5.29 ^c	254.17 $\pm$ 69.79 ^{ab}
A-MPDB 5	20		38.46 $\pm$ 1.78 ^b	254.39 $\pm$ 14.85 ^{ab}
A-MPDB 6		50	47.73 $\pm$ 6.78 ^a	322.52 $\pm$ 14.74 ^a
A-MPDB 7		100	24.40 $\pm$ 3.82 ^{de}	326.45 $\pm$ 34.28 ^a
A-MPDB 8		150	24.28 $\pm$ 4.39 ^{de}	239.00 $\pm$ 24.28 ^b
A-MPDB 9		200	18.65 $\pm$ 1.71 ^e	295.41 $\pm$ 41.81 ^{ab}
F-test			**	*
CV%			13.14	13.44

หมายเหตุ: *=Significant difference at $P<0.05$, **=Significant difference at $P<0.01$, MPDB=Modified of potato dextrose broth, YE=Yeast extract, MeJA=Methyl jasmonate

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์และสารละลายเมทิลจัสโมเนตที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเจริญของเส้นใยของเห็ดถึงเข้าสู่สีทองในสภาพปลอดเชื้อ จะเห็นได้ว่าสารสกัดยีสต์เป็นสารกระตุ้นที่สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยของเห็ดถึงเข้าสู่สีทองได้ดีกว่าสารละลายเมทิลจัสโมเนต ซึ่งเห็นได้จากน้ำหนักแห้ง โดยสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยของเห็ดถึงเข้าสู่สีทองได้ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัดยีสต์อุดมไปด้วยไนโตรเจน วิตามิน และสารส่งเสริมการเจริญเติบโตจึงถูกนำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์[23] แต่เส้นใยของเห็ดถึงเข้าสู่สีทองเมื่อได้รับสารกระตุ้นด้วยสารละลายเมทิลจัสโมเนตทุกระดับความเข้มข้นส่งผลให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยลดลง อาจเนื่องมาจากจัสโมเนตมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต โดยยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและการเพิ่มขนาดของเซลล์[26] สอดคล้องกับการศึกษาของ Qu et al.[27] ที่รายงานว่าเมทิลจัสโมเนตมีผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลงโดยมีค่าเป็น 0.7 เท่าของน้ำหนักแห้งของสิ่งทดลองควบคุม

เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์และสารละลายเมทิลจัสโมเนตที่เหมาะสมต่อจำนวนดอก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถึงเข้าสู่สีทอง แสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายเมทิลจัสโมเนตในอาหารเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นต่ำส่งผลต่อการกระตุ้นการเกิดดอกของเห็ดถึงเข้าสู่สีทองเพิ่มขึ้น โดยสารละลายเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้ผลผลิตจำนวนดอกดีที่สุด จึงทำให้มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเมทิลจัสโมเนตเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang & Turner[26] ที่รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงรากพิเศษของ *Panax ginseng* ด้วยอาหารที่มีกรดจัสโมนิก (Jasmonic acid; JA) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นกลุ่มเดียวกับเมทิลจัสโมเนตความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดจัสโมนิกเพิ่มขึ้น โดยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมีค่าน้อยเมื่อเติมกรดจัสโมนิกความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (4.67 ± 0.09 และ 0.41 ± 0.01 กรัม) ในขณะที่รากของสิ่งทดลองควบคุมมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 16.15 ± 0.03 และ 1.47 ± 0.07 กรัม ตามลำดับ ส่วนการเติมสารสกัดยีสต์ในอาหารเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นสูงส่งผลให้จำนวนดอก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Yu et al.[28] รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* Bunge ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดยีสต์ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 16 วัน พบว่า สารสกัดยีสต์ทุกความเข้มข้นทำให้น้ำหนักเซลล์แขวนลอยลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม อาจเนื่องมาจากสารสกัดยีสต์มีผลต่อการดูดและการสะสมน้ำในเซลล์ของพืช[29] และ Chong et al.[30] รายงานว่า

การที่นำหนัทยอดหรือเซลล์พืชลดลงอาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นบางชนิดมีผลทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมสารปฐมภูมิลดลง ในขณะที่กระบวนการเมตาบอลิซึมของสารทุติยภูมิเกิดการเปลี่ยนแปลงกะทันหัน หรือ Namdeo[31] รายงานว่าสารกระตุ้นที่มีความเข้มข้นสูงสามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาอย่างรวดเร็ว และนำไปสู่การตายของเซลล์

เปรียบเทียบค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดง (a^*) ค่าสีเหลือง (b^*) และค่าเฉดสี Hue angle เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดจากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหารต่างๆ ของทุกการทดลอง พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีแดง (a^*) ค่าสีเหลือง (b^*) และค่าเฉดสี Hue angle มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามสีของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองเมื่อมองด้วยตาเปล่า พบว่า ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองให้สีที่ไม่แตกต่างกันโดยมีสีเหลืองส้มเหมือนกันทุกการทดลอง ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้แยกสารออกจากกัน โดยอาศัยหลักการโครมาโทกราฟี

เปรียบเทียบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิเคราะห์หาปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซพินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่มีอายุ 60 วัน พบว่าสารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดส่งผลให้ดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณสารอะดีโนซีนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) จะเห็นได้ว่าการเติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทในอาหารเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซพินลดลง จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเติมสารละลายเมทิลจัสโมเนทในอาหารเพาะเลี้ยงในระดับความเข้มข้นต่ำมีผลต่อประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซพินได้ดีกว่าสารสกัดยีสต์ โดยสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพดีที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารละลายเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถกระตุ้นให้เห็ดถั่งเช่าสีทองผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซพินเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Rungruang et al.[32] ที่กระตุ้นเซลล์แขวนลอยของถั่วเหลืองด้วยเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 0 50 100 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ พบว่าเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุดเท่ากับ 81.16 mg GAE/100gDW และ 86.11 μ g TE/100gDW ตามลำดับ โดยทุกความเข้มข้นยับยั้งการเจริญเติบโต แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกภายในเซลล์สูงกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับการศึกษาของ Juengwatanatrakul et al.[33] เคยรายงานว่าการใช้เมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50-200 มิลลิโมลาร์ ในการกระตุ้นการสร้างสารพลัมบาจิน (Plumbagin) ใน *Drosera indica* และพบว่าสามารถผลิตสารพลัมบาจินได้มากที่สุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเมทิลจัสโมเนทความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แต่อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อสารกระตุ้นที่แตกต่างกันนี้ เนื่องจากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ ความแข็งแรงของสายพันธุ์ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง สภาวะการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารกระตุ้น รวมไปถึงวิธีการสกัดและวิเคราะห์สารและอื่นๆ ดังนั้นควรศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการรับสารละลายเมทิลจัสโมเนทเพื่อกระตุ้นให้เห็ดถั่งเช่าสีทองผลิตสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซพินให้สูงขึ้นต่อไป

References

- [1] Das, S. K., et al. (2010). Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), 961-968.
- [2] Tapingkae, T. (2018). *Cultivation of cordyceps mushrooms as a profession*. 3rd ed. Bangkok: Kehakaset. (in Thai)
- [3] Kitakaze, M., & Hori, M. (2000). Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure. *Expert opinion on investigational drugs*, 9(11), 2519-2535.
- [4] Ashraf, S. A., et al. (2020). Cordycepin for Health and Wellbeing: A Potent Bioactive Metabolite of an Entomopathogenic Cordyceps Medicinal Fungus and Its Nutraceutical and Therapeutic Potential. *Molecules*, 25(12), 2735.
- [5] Yun, Y. H., et al. (2003). Anti-diabetic Effects of CCCA, CMES, and Cordycepin from *Cordyceps militaris* and the Immune Responses in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Natural Product Sciences*,

- 9(4), 291-298.
- [6] Nakamura, K., et al. (2005). Effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on hematogenic lung metastatic model mice. *in vivo*, 19, 137-141.
- [7] Li, C., et al. (2006). The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 800-805.
- [8] Yu, H. M., et al. (2006). Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3132-3138.
- [9] Schmidt, K., et al. (2003). Screening of entomopathogenic Deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), 251-260.
- [10] Lee, H. J., et al. (2012). The nucleoside antagonist cordycepin causes DNA double strand breaks in breast cancer cells. *Investigational new drugs*, 30(5), 1917-1925.
- [11] Dai, G., et al. (2001). CordyMax™ Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7(3), 231-240.
- [12] Yoshikawa, N., et al. (2004). Antitumour activity of cordycepin in mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31, S51-S53.
- [13] Weil, M. K., & Chen, A. P. (2011). PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer. *Current problems in cancer*, 35(1), 7-50.
- [14] Kim, S. Y., et al. (2010). Optimum Conditions for Artificial Fruiting Body Formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiology*, 38(2), 133-136.
- [15] Lim, L., et al. (2012). Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*, 14(2), 181-187.
- [16] Yosmethakun, R. & Singpoonga, N. (2018) Cordycepin and adenosine production from *Cordyceps militaris* in cereal medium. *Agricultural Science Journal*, 49(1), 168-171. (in Thai)
- [17] Subnugarn, S. and Hongsaeng, P. (2013) Influence of Growth Regulators on Micropropagation of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Rajabhat Agriculture Journal*, 12(1), 1-11. (in Thai)
- [18] Prasartsin, P., et al. (2017). Enhancement of plumbagin production in cell suspension derived from hairy root of *Plumbago indica* L. by methyl jasmonate elicitation in B5 medium. *Agricultural Science Journal*, 48(1), 139-150. (in Thai)
- [19] Chaichana, N., & Dheeranupattana, S. (2012). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on alkaloid production from *in vitro* culture of *Stemona* sp. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(3), 146-150.
- [20] Lu, M., et al. (2001). Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 20(7), 674-677.
- [21] Jirapongpattana, R. et al. (2017). Effects of Jasmonic acid and Yeast Extract on Secondary Metabolite Contents in Shoot Culture of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *Journal of Science and Technology*, 25(3), 486-496. (in Thai)
- [22] Cheong, J. J. & Choi, Y. D. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in genetics*, 19(7), 409-413.
- [23] Jirapongpattana, R. (2016). *Effects of Jasmonic acid and Yeast Extract on Secondary Metabolite*

- Contents in Shoot Culture of Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. (Master thesis, Thammasart University). (in Thai)
- [24] Inyod, T., et al (2021). The Study of Optimum Growth Condition in Some Ectomycorrhizal Mushroom *in Vitro*. *Naresuan Agriculture Journal*, 18(1), 1-13. (in Thai)
- [25] Zeng, W. B., et al. (2014). Distribution of nucleosides in populations of *Cordyceps cicadae*. *Molecules*, 19(5), 6123-6141.
- [26] Zhang, Y. I. & Turner, J. G. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLOS ONE*, 3(11), e3699.
- [27] Qu, J., et al. (2011). A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107, 261-269.
- [28] Chen, H. & Chen, F. (2000). Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. *Process Biochemistry*, 35(8), 837-840.
- [29] Chong, T. M., et al. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*, 40(11), 3397-3405.
- [30] Yu, K. W., et al. (2002). Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biochemical Engineering Journal*, 11(2-3), 211-215.
- [31] Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 69-79.
- [32] Rungruang, R., et al. (2015). The accumulation of total phenolic content and antioxidant activity in suspension culture of *Glycine max* by methyl jasmonate. *Agricultural Science Journal*, 46(3), 81-84. (in Thai)
- [33] Juengwatanatrakul, T., et al. (2011). Elicitation effect on production of plumbagin in *in vitro* culture of *Drosera indica* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4949-4953.