

ผลของระยะเวลากระตุ้นด้วยสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณสารทุติยภูมิของ ยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพ ปลอดเชื้อ

Effect of Yeast Extract Elicitation Period on Secondary Metabolite Contents of *in vitro* *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill Shoots

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, รัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ศรียโสภา เรืองหนู และอรุณพร อธิรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Ratchaneewan Jirapongpattana, Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Srisopa Ruangnoo and Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สารสกัดยีสต์ (yeast extract) เป็นสารกระตุ้นที่เพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของระยะเวลาในการได้รับสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงข้อหัวข้าวเย็นบนอาหารสูตร MS ที่เติมหรือไม่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L เป็นระยะเวลานาน 1, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ 2x4 factorial in completely randomized design (CRD) ผลการทดลองพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารสกัดยีสต์และระยะเวลาในการได้รับสารสกัด

*ผู้รับผิดชอบบทความ : yjirakia@tu.ac.th

ยีสต์ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด โดยยอดที่พัฒนามาบนอาหารสูตร MS ที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L นาน 2 สัปดาห์ มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุด $1,233.33 \pm 47.15$ μg diosgenin/g dry extract หรือเพิ่มขึ้น 1.93 เท่า ของยอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม สารสกัดยีสต์ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

คำสำคัญ : *Dioscorea birmanica*; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด; สารทุติยภูมิ

Abstract

Yeast extract (YE) is an elicitor that can enhance secondary metabolite contents in many medicinal plants. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of the YE elicitation period on total saponin content, total phenolic content, and DPPH radical scavenging activity of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill shoot under aseptic conditions. Node explants were cultured on MS medium supplemented with or without 3 g/L YE for 1, 2, 4 and 6 weeks. The experiment was arranged in 2 x 4 factorial in completely randomized design (CRD). The results revealed that there was an interaction between YE supplementation and elicitation period on total saponin content. The highest total saponin content of $1,233.33 \pm 47.15$ μg diosgenin/g dry extract or 1.93 times of non-YE shoots was achieved when the shoots were grown on MS medium supplemented with 3 g/L YE for 2 weeks. However, YE had no effect on total phenolic content and DPPH radical scavenging activity.

Keywords: *Dioscorea birmanica*; elicitor; total phenolic content; secondary metabolite

1. บทนำ

หัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ส่วนของเหง้าร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคน้ำเหลืองเสีย โรคเอดส์ [1] มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ด้านเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [2] พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาเลื้อย มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า และทุกส่วนมีหนาม พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบบริเวณป่าดิบเขาและป่าโปร่ง [3] เนื่องจากสรรพคุณในการรักษาโรค จึงมีการนำมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและศึกษาสารทุติยภูมิที่สกัดได้จากยอดที่

ขยายพันธุ์ด้วยวิธีดังกล่าว โดย Jirakiattikul และคณะ [4] รายงานว่ายอดหัวข้าวเย็นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการสร้างและสะสมสาร diosgenin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) - β -D-glucopyranoside (DBS1) ซึ่งเป็นสารกลุ่มซาโปนิน (saponin) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แต่ปริมาณสารที่สกัดได้จากยอดในสภาพปลอดเชื้อนี้น้อยกว่าเหง้าแม่ที่ปลูกในแปลง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดของยอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้กรดจัสโมนิก (jasmonic acid, JA) และสารสกัดยีสต์ (yeast extract) พบว่าการเติมสารสกัดยีสต์ความ

เข้มข้น 3 g/L ส่งผลให้ยอดหัวข้าวเย็นมีการสร้างและสะสมสารซาโปนินเพิ่มขึ้นสูงกว่า JA [5]

มีการนำสารสกัดยีสต์ ซึ่งเป็นเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว มาใช้เพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิในพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น พรหมิ (*Bacopa monnieri* L.) [6] *Silybum marianum* L. [7] โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) [8] *Perovskia abrotanoides* Karel [9] และยอดหัวข้าวเย็นตามรายงานของ Jirapongpattana และคณะ [5] ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น การที่สารสกัดยีสต์สามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิได้นั้น เนื่องจากพืชมีกลไกป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคด้วยการสร้างสารขึ้นมา [10] ซึ่งระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมีผลต่อการตอบสนองของพืชและมักต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด [11] ดังรายงานการเพาะเลี้ยงรากของ *P. ginseng* ที่เติม JA ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5 และ 10 mg/L เป็นเวลา 0-9 วัน พบว่าสาร ginsenoside เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงรากในอาหารที่เติม JA ความเข้มข้น 2 mg/L เป็นเวลา 7 วัน [12] หรือ Wiktorowska และคณะ [13] เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Calendula officinalis* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้น 5 ชนิด คือ chitosan, JA, pectin, สารสกัดยีสต์ และรา *Trichoderma viride* เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าสารกระตุ้นทุกชนิดสามารถชักนำให้เซลล์แขวนลอยสร้างและสะสมสารในปริมาณที่ต่างกัน โดยปริมาณ oleanolic acid (OA) ในเซลล์สูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วย JA ความเข้มข้น 50 และ 100 μ M นาน 72 ชั่วโมง chitosan ความเข้มข้น 50 mg/L นาน 96 ชั่วโมง สารสกัดยีสต์ ความเข้มข้น 300 mg/L นาน 72 ชั่วโมง pectin ความเข้มข้น 2 และ 4 mg/L นาน 48 ชั่วโมง และรา *T. viride* ความเข้มข้น 0.5 mg/L นาน 48 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นมีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงมี

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของระยะเวลาในการได้รับสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติมผงถ่าน 0.01 %, 6-benzyl-adenine (BA) ความเข้มข้น 2 mg/L, indole-3-acetic acid (IAA) ความเข้มข้น 0.1 mg/L, น้ำมะพร้าว 20 %, น้ำตาลทราย (sucrose) 3 %, และวุ้นความเข้มข้น 0.8 % เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มาตัดเป็นท่อน ๆ ให้มีความยาวประมาณ 1 cm แล้วเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชดังกล่าวบนอาหารสูตรเดิมรวมหรือไม่ร่วมกับสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดตามรายงานของ Jirapongpattana และคณะ [5] วางแผนการทดลองแบบ 2x4 Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 คือ การได้รับสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L หรือไม่ได้รับสารสกัดยีสต์ ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 1, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ (รูปที่ 1) นำยอดไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 °C ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง 3,000 lux ด้วยหลอดไฟ fluorescence แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g

เมื่อครบระยะเวลาการเพาะเลี้ยง นำยอดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 48 ชั่วโมง สกัดสารและวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Hiai และคณะ [14] สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Folin และ Ciocalteu [15] และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีของ Yamasaki และคณะ [16] ตามที่ได้อธิบายใน

Jirapongpattana และคณะ [5]

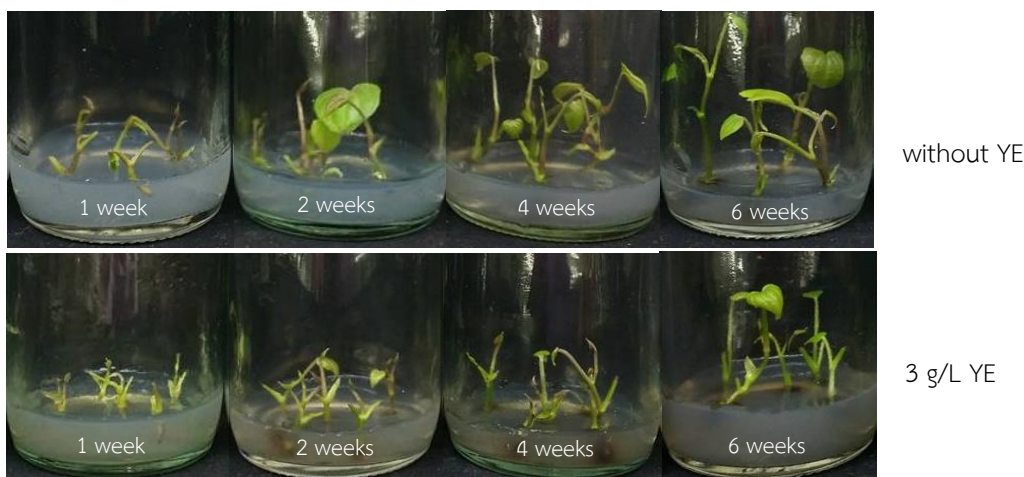


Figure 1 *In vitro* *D. birmanica* shoots grown on MS medium supplemented with 0.01% activated charcoal, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA and 20% coconut water in combination with or without 3 g/L yeast extract (YE) for 1, 2, 4 and 6 weeks.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธี 2x4 factorial in CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SAS

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 น้ำหนักสดและแห้งของยอด

ยอดหัวข้าวเย็นที่พัฒนาบนอาหารที่เติมหรือไม่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L เป็นเวลา 1, 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารสกัดยีสต์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อน้ำหนักสดและแห้งของยอด โดยพบว่าน้ำหนักสดและแห้งของยอดที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดยีสต์เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 2A และ 2B) แต่ยอดที่เพาะเลี้ยงบน

อาหารที่เติมสารสกัดยีสต์นาน 2-6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสด (22.11 ± 2.48 ถึง 30.69 ± 1.25 mg/shoot) และแห้ง (3.36 ± 0.46 ถึง 5.57 ± 0.35 mg/shoot) น้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมสารสกัดยีสต์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน โดยยอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารสกัดยีสต์นาน 6 สัปดาห์ มีน้ำหนักสดและแห้งสูงสุด 46.65 ± 2.67 และ 8.63 ± 0.41 mg/shoot ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดยีสต์มีผลในทางลบต่อการเจริญเติบโตของยอดหัวข้าวเย็น และมีผลมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งผลของระยะเวลาในการได้รับสารกระตุ้นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรืออวัยวะที่เพาะเลี้ยงได้มีรายงานแล้วเช่นกัน ดังการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *C. officinalis* บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง พบว่าการเติม JA chitosan หรือสารสกัดยีสต์ไม่มีผลต่อการ

เจริญเติบโตที่ 72 ชั่วโมงแรก แต่ที่ 96 ชั่วโมงหลังได้รับสารกระตุ้น เซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง โดยการได้รับสาร JA ที่ความเข้มข้น 50 μM และ chitosan ความเข้มข้น 150 mg/L นาน 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลงมากถึง 18 และ 22 % เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งทดลองควบคุม ส่วนการเพิ่มรา *T. viride* พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มลดลงหลังจากได้รับสารนาน 24 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตลดลงมากถึง 42 % หลังจากได้รับสารนาน 96 ชั่วโมง [13] ซึ่ง Yu และคณะ [12] และ Chong และคณะ [17] กล่าวว่า การที่น้ำหนักยอดหรือเซลล์ลดลง อาจเนื่องมาจากสารกระตุ้นมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม

ทำให้สารประกอบปฐมภูมิลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารทุติยภูมิ จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ อย่างไรก็ตาม มีพืชบางชนิดที่รายงานว่า การเพิ่มสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเพาะเลี้ยงรากของ *Perovskia abrotanoides* Karel บนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 2 mg/L ร่วมกับ AgNO_3 , sorbitol, สารสกัดยีสต์ และ MeJA (methyl jasmonate) พบว่าทุกสิ่งทดลองมีน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสิ่งทดลองควบคุม [9]

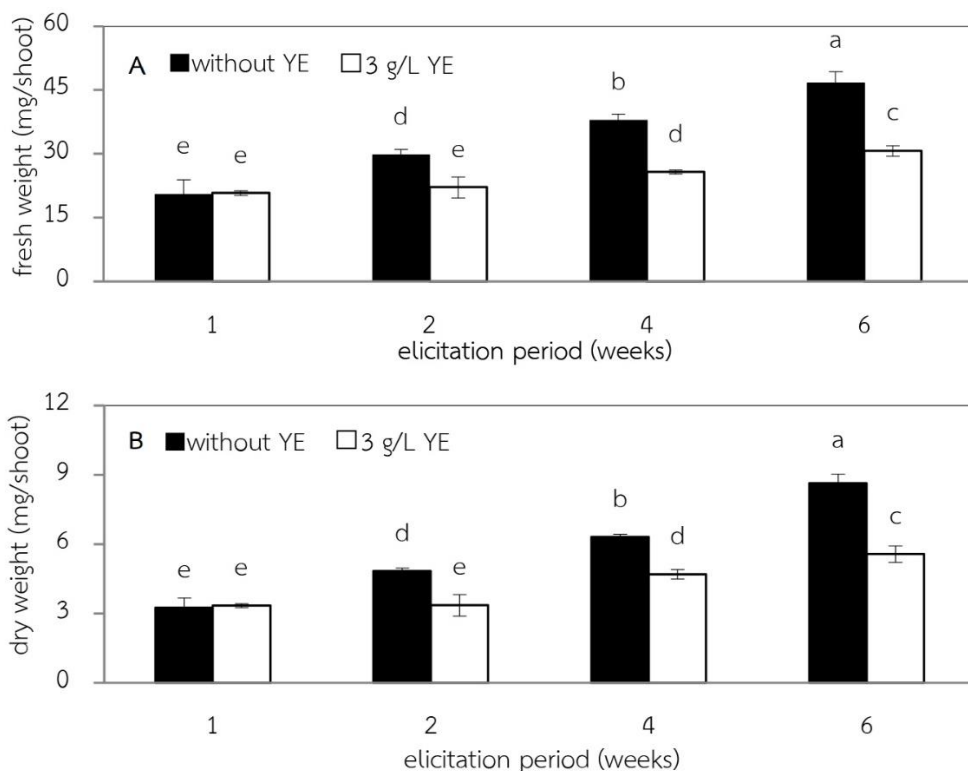


Figure 2 Fresh weight (A) and dry weight (B) of *in vitro* *D. birmanica* shoots after cultured on MS medium supplemented with 0.01 % activated charcoal, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 20 % coconut water and 0-3 g/L yeast extract (YE) for 1, 2, 4 and 6 weeks. (Different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's new multiple range test.)

3.2 ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด

การทดลองพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารสกัดยีสต์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติมสารสกัดยีสต์มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สอดคล้องกับ Jirapongpattana และคณะ [18] ที่ได้รายงานว่ายอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนาน 8-12 สัปดาห์ มีปริมาณสาร DBS1 ซึ่งเป็นสารในกลุ่มซาโปนินสูงกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงนาน 4-6 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม สารซาโปนินทั้งหมดของยอดที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติมสารสกัดยีสต์ มีปริมาณน้อยกว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน (รูปที่ 3) ซึ่งยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์ ความเข้มข้น 3 g/L นาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดสูงสุด, 247.62 ± 50.33 μg diosgenin/g dry extract แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวเมื่อยอดพัฒนามบนอาหารที่เติมสารสกัด

ยีสต์นาน 2 และ 6 สัปดาห์ ($1,233.33 \pm 47.15$ และ $1,148.57 \pm 60.47$ μg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ) โดยปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดที่ได้จากยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์ นาน 2, 4 และ 6 สัปดาห์นี้ มีค่าสูงกว่ายอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์ 1.93 1.42 และ 1.13 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน (638.10 ± 15.74 , 880.95 ± 86.72 และ $1,019.05 \pm 111.11$ μg diosgenin/g dry extract ตามลำดับ) ส่วนยอดที่พัฒนามบนอาหารที่สารสกัดยีสต์เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ ก็สามารถสร้างสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้น มีค่า 646.67 ± 61.63 μg diosgenin/g dry extract ซึ่งสูงกว่า 1.41 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์นาน 1 สัปดาห์ (459.05 ± 22.19 μg diosgenin/g dry extract)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดยีสต์สามารถกระตุ้นการสร้างสารซาโปนินทั้งหมดในยอดหัวข้าวเย็น และระยะเวลาที่ได้รับสารกระตุ้นมีผลต่อการสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมดด้วย โดย Ramachandra Rao และ Ravishankar [19] กล่าวว่า การที่พืชถูกกรูกรานโดยเชื้อโรค มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคในเซลล์

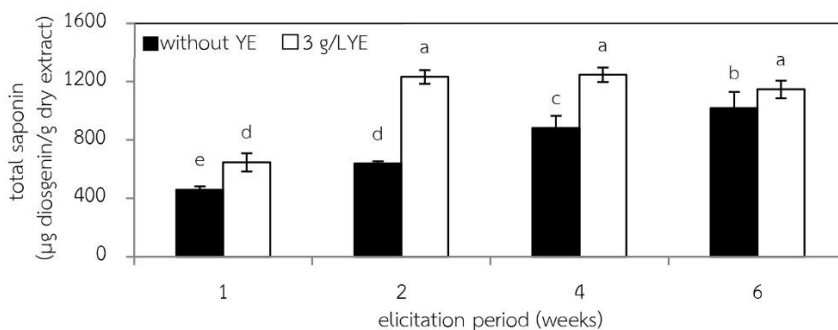


Figure 3 Total saponin content of *in vitro* *D. birmanica* shoots after cultured on MS medium supplemented with 0.01 % activated charcoal, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 20 % coconut water and 0-3 g/L YE for 1, 2, 4 and 6 weeks. (Different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's new multiple range test.)

พืชขึ้นด้วยการตอบสนองต่าง ๆ รวมไปถึงการสะสมของสารทุติยภูมิ นอกจากนี้ Vasconsuelo และ Boland [11] ยังได้กล่าวไว้ว่าสารกระตุ้นสามารถกระตุ้นเซลล์พืชตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยง และมีการสัมผัสสารจนกว่าจะมีการเก็บเกี่ยว ดังนั้นการหาระยะเวลาที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ และจำเป็นต้องศึกษาถึงรายละเอียดในการเพาะเลี้ยงพืชแต่ละชนิด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับพืชสมุนไพรหลายชนิดที่เติมสารสกัดยีสต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสามารถส่งเสริมให้สร้างและสะสมสารทุติยภูมิในกลุ่มไกลโคไซด์และซาโปนินได้ เช่น *B. monnieri* L. [6], *S. marianum* L. [7], *P. ginseng* C.A. Meyer [8], *P. abrotanoides* Karel [9] และ *C. officinalis* L. [13] อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นและระยะเวลาในการได้รับสารจะต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังเช่นยอดของ *B. monnieri* L. สามารถเพิ่มปริมาณสาร pseudo jujubogenin glycosides 40.05 ± 2.37 mg/g DW ซึ่งสูงถึง 6 เท่าของสิ่งทดลองควบคุม เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 2 mg/mL เป็นเวลา 7 วัน [6] หรือในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอายุ 0, 5, 10 และ 15 วัน ของ *P. ginseng* ในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 0.5-3.0 g/L เป็นเวลา 25 วัน พบว่าการเติมสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L ให้กับเซลล์แขวนลอยที่อายุ 0 วัน สามารถเพิ่มปริมาณสารซาโปนินได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุมถึง 20 เท่า [8]

3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การทดลองพบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารสกัดยีสต์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ตารางที่ 1) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเติมหรือไม่เติมสารสกัดยีสต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม และไม่เติมสารสกัดยีสต์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

70.86 ± 5.33 และ 70.74 ± 10.53 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยพบว่ายอดที่พัฒนามบนอาหารเป็นเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด 77.84 ± 5.93 และ 75.82 ± 6.38 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) กับปริมาณสารดังกล่าวเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ (61.36 ± 2.74 และ 68.18 ± 4.25 mg GAE/g dry extract ตามลำดับ)

Table 1 Total phenolic content of *in vitro* *D. birmanica* shoots after cultured on MS medium supplemented with 0.01 % activated charcoal, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 20 % coconut water in combination with or without 3 g/L YE for 1, 2, 4 and 6 weeks.

Treatments		Total phenolic content (mg GAE/g dry extract)
Elicitor (E)	without YE	70.74 ± 10.53
	3 g/L YE	70.86 ± 5.33
Elicitation period	1	$61.36 \pm 2.74^{c1/}$
(P: weeks)	2	68.18 ± 4.25^b
	4	77.84 ± 5.93^a
	6	75.82 ± 6.38^a
E		ns
P		**
E x P		ns
C.V. (%)		7.37

^{1/} Mean values (means $\pm$ SDs), within a column followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's new multiple range test; ** significantly different at $p < 0.01$; ns not significantly different

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดยีสต์ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากกลไกในการกระตุ้นของสารสกัดยีสต์อาจไม่ส่งผลต่อการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของพืชชนิดนี้ สอดคล้องกับการศึกษาในยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prian & Burkill) ที่ใช้สารกระตุ้นคนละชนิด โดยพบว่ายอดที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารกระตุ้น JA ความเข้มข้น 100, 250 และ 500 μM และ SA ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า 47.44 ± 9.25 ถึง 53.54 ± 3.85 mg/GAE/g dry extract [20] หรือจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Silybum marianum* L. บนอาหารที่เติม chitosan SA และ MeJA ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารกระตุ้นทุกชนิดทุกความเข้มข้นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่าสิ่งทดลองควบคุม [21] ขณะที่ Yan และคณะ [22] พบว่าสารสกัดยีสต์สามารถส่งเสริมให้พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นโดยเพาะเลี้ยงเซลล์รากของ *Salvia miltiorrhiza* ในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์และ Ag^+ เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 200 mg/L สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงกว่าสิ่งทดลองควบคุม 20 % เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของสารกระตุ้นต่อการสร้างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดก็จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50})

การทดลองพบว่ามีการปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเติมสารสกัดยีสต์และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็น (รูปที่ 4) โดยยอดที่พัฒนามบนอาหารที่ไม่เติมสารกระตุ้นเป็น

เวลา 4 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด มีค่า EC_{50} 31.58 ± 2.42 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) กับค่า EC_{50} ของสิ่งทดลองอื่น ส่วนยอดที่พัฒนามบนอาหารที่เติม และไม่ได้เติมสารสกัดยีสต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด โดยมีค่า EC_{50} 68.45 ± 5.76 และ 72.82 ± 3.44 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แต่การเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์เป็นระยะเวลานานขึ้นหรือนาน 6 สัปดาห์ พบว่ามีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่ายอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดยีสต์ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1-4 สัปดาห์ หากเพาะเลี้ยงนานขึ้นเป็น 6 สัปดาห์ สารสกัดยีสต์ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้น แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดที่ได้รับสารสกัดยีสต์นาน 6 สัปดาห์ นี้น้อยกว่ายอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์นาน 4 สัปดาห์ ซึ่งการตอบสนองของพืชต่อสารกระตุ้นนี้จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด เช่นเดียวกับปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังรายงานของ Rodrigues-Brandão และคณะ [23] ที่ได้ศึกษาเพาะเลี้ยงข้อของ *Alternanthera tenella* ในอาหารเหลวที่เติม SA ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใบมาวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นไม่มีผลต่อ % inhibition โดย % inhibition ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง แต่ในการเพาะเลี้ยงรากแขวนลอยของ *P. ginseng* ที่ได้รับ SA ความเข้มข้น 200 μM นาน 9 วัน ส่งผลให้รากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด [24]

การวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดหัวข้าวเย็นเมื่อได้รับสาร

สก็ดยีสต์ที่ระยะเวลาต่างกัน พบว่าปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อได้รับสารสก็ดยีสต์นาน 2-6 สัปดาห์ ขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีฤทธิ์ดีขึ้นเมื่อได้รับสารสก็ดยีสต์นาน 6 สัปดาห์ และสารสก็ดยีสต์ไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วยสารสก็ดยีสต์นาน 2-6 สัปดาห์ ส่งผลให้ปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นเท่านั้น ขณะที่สารสก็ดยีสต์ไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทั้งนี้อาจเนื่องจากกลไกในการกระตุ้นของสารสก็ดยีสต์ และระยะเวลาในการกระตุ้นไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Hasanloo และคณะ [7] ที่เพาะเลี้ยงเซลล์รากขนของ *S. marianum* L. บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารสก็ดยีสต์ความเข้มข้น 2.5 mg/50 mL เป็นเวลา 0-120 ชั่วโมง พบว่าเซลล์รากขนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสก็ดยีสต์มีค่า IC_{50} ลดน้อยลงกว่าในสิ่งทดลองควบคุมหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 72-120 ชั่วโมง ขณะที่ปริมาณ

สาร silymarin เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง และลดลงเมื่อได้รับสารสก็ดยีสต์นาน 96-120 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นให้สาร silymarin เพิ่มขึ้นเป็นเวลาที่เซลล์รากขนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ หรือจากการทดลองของ Rodrigues-Brandão และคณะ [22] ที่เพาะเลี้ยงข้อของ *A. tenella* ในอาหารที่เติม SA ความเข้มข้น 400 μ M เป็นเวลา 0-48 ชั่วโมง พบว่าสาร betacyanin เพิ่มขึ้นหลังได้รับสาร 36-48 ชั่วโมง ขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12-36 ชั่วโมง ส่วนสารฟลาโวนอยด์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 0 และ 12 ชั่วโมง โดยที่ 36 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลงมากถึง 18 % แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ได้รับสารเพื่อกระตุ้นการสร้างสารฟลาโวนอยด์ให้เพิ่มขึ้นนั้นไม่สัมพันธ์กับ betacyanin และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ดังนั้นจากผลการทดลองนี้สามารถกล่าวได้ว่าการเติมสารสก็ดยีสต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอดของหัวข้าวเย็น ทำให้ยอดมีการสร้างและสะสมปริมาณสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้น ทุกระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

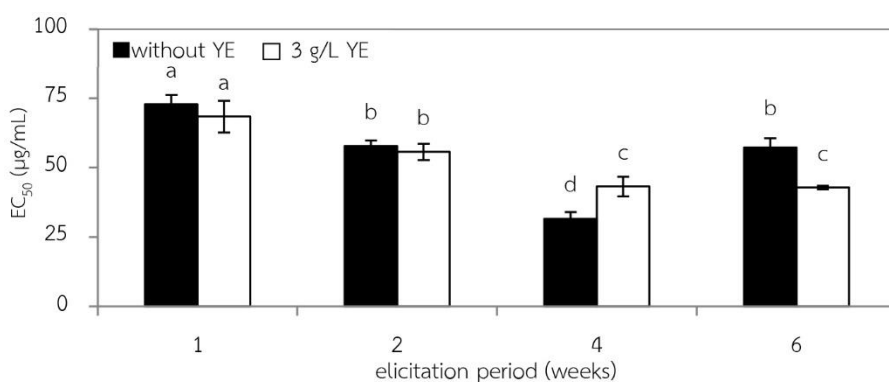


Figure 4 DPPH radical scavenging activity of *in vitro* *D. birmanica* shoots after cultured on MS medium supplemented with 0.01 % activated charcoal, 2 mg/L BA, 0.1 mg/L IAA, 20 % coconut water and 0-3 g/L YE or 1, 2, 4 and 6 weeks. (Different letters are significantly different at $p < 0.05$ according to Duncan's new multiple range test.)

โดยเพิ่มขึ้น 1.41-1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์ แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เนื่องจากสารทุติยภูมิที่สำคัญในหัวข้าวเย็น (*D. birmanica*) คือ สารซาโปนินทั้งหมด ดังนั้นจึงควรเพิ่มสารสกัดยีสต์ความเข้มข้น 3 g/L ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยอด และเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณสารซาโปนินทั้งหมด $1,233.33 \pm 47.15 \mu\text{g}$ diosgenin/g dry extract หรือเพิ่มขึ้น 1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับ YE นาน 2 สัปดาห์ ซึ่งยอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดยีสต์นี้จะเป็นวัตถุดิบอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการแพทย์ ถึงแม้ปริมาณสารจะเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า แต่ก็สามารถผลิตยอดหัวข้าวเย็นได้ตลอดเวลา คุณภาพและปริมาณสารสม่ำเสมอ เนื่องจากเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพียง 2 สัปดาห์ โดยไม่ต้องไปเก็บหัวข้าวเย็นในป่าธรรมชาติที่ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตมากกว่า 1 ปีขึ้นไป

4. สรุป

ยอดหัวข้าวเย็นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรพื้นฐานที่เติมสารสกัดยีสต์ ความเข้มข้น 3 g/L เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สามารถสร้างและสะสมสารซาโปนินทั้งหมดเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงสุด และใช้เวลาน้อยที่สุด โดยมีค่า $1,233.33 \pm 47.15 \mu\text{g}$ diosgenin/g dry extract หรือ 1.93 เท่าของยอดที่ไม่ได้รับสารสกัดยีสต์ ($638.10 \pm 15.74 \mu\text{g}$ diosgenin/g dry extract) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเท่ากัน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2557

6. References

- [1] Itharat, A., Jaiarree, N. and Kumapava, K., 2010, Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, J. Med. Assoc. Thai. 93: 192-197.
- [2] Jaiarree, N., Itharat, A., Kumapava, K., 2010, Cytotoxic saponin against lung cancer cell from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, J. Med. Assoc. Thai. 93: 97-192.
- [3] Wilkin, P. and Thapayai, C., 2009, Dioscoreaceae, pp. 1-140, In Santisuk, T. and Larsen, k. (Eds.), Flora of Thailand 10, Prachachon, Bangkok.
- [4] Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsri, O., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2016, *In vitro* propagation and bioactive compound accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, Acta Physiol. Plant 38: 249.
- [5] Jirapongpattana, R., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2017, Effects of jasmonic acid and yeast extract on secondary metabolite contents in shoot culture of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill, Thai Sci. Technol. J. 25: 485-496. (in Thai)
- [6] Kamonwannasit, S., Phrompittayarat, W., Ingkaninan, K., Tanaka, H. and Putalun, W., 2008, Improvement of pseudogujubogenin glycosides production from regenerated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and

- enhanced yield by elicitors, Z. Naturforsch. 63: 879-883.
- [7] Hasanloo, T., Sepehrifar, R., Rahnama, R. and Shams, M. R., 2009, Evaluation of the yeast-extract signaling pathway leading to silymarin biosynthesis in milk thistle hairy root culture, World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1901-1909.
- [8] Lu, M.B., Wong, H.L. and Teng, W.L., 2001, Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*, Plant Cell Rep. 20: 674-677.
- [9] Zaker, A. , Sykora, C. , Gössnitzer, F. , Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S. H. and Wawrosch, C. , 2015, Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel, Ind. Crop Prod. 67: 97-102.
- [10] Matkowski, A., 2008, Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – a review, Biotechnol. Adv. 26: 548-560.
- [11] Vasconsuelo, A. and Boland, R., 2007, Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants, Plant Science. 172: 861-875.
- [12] Yu, K.W., Gao, W., Hahn, E.J. and Paek, K. Y. , 2002, Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Mayer, Biochem. Eng. J. 11: 211-215.
- [13] Wiktorowska, E., Dlugosz, M. and Janiszowska, W., 2010, Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L, Enzyme Microb. Tech. 46: 14-20.
- [14] Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T., 1976, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, Plant. Med. 29: 116-122.
- [15] Folin, O. and Ciocalteu, V. , 1927, On tyrosine and tryptophan determination in proteins, J. Biol. Chem. 27: 627-650.
- [16] Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y. , Miyamoto, T. and Sato, T. , 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol extracts of crude drugs, Chem. Pharm. Bull. 42: 1663-1665.
- [17] Chong, T.M., Abdullah, M.A., Lai, O.M., Aini, F. M. N. and Lajis, N. H. , 2005, Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture, Process Biochem. 40: 3397-3405.
- [18] Jirapongpattana, R., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Ruangnoo, S. and Itharat, A., 2016, Secondary metabolites contents of *in vitro* Hua- Khao- Yen (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) shoots at different culture periods, Thai Sci. Technol. J. 24: 40-48. (in Thai)
- [19] Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G. A. , 2002, Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites,

- Biotechnol. Adv. 20: 101-153.
- [20] Boonyuen, T., 2014, Effects of Jasmonic Acid and Salicylic Acid on Dioscorealide B in Shoot Culture of *Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill, Master Thesis, Thammasat University, Patumthani, 85 p.
- [21] Gabr, A. M. M. , Ghareeb, H. , Shabrawi, H.M.E., Smetanska, I. and Bekheet, S. A., 2016, Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures, J. Genet. Eng. Biotechnol. 14: 327-333.
- [22] Yan, Q., Shi, M., Ng, J. and Wu, J.Y., 2006, Elicitor- induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, Plant Sci. 170: 853–858.
- [23] Rodrigues-Brandão, I. , Kleinowski, A. M. , Einhardt, A.M., Lima, M.C., Amarante, L.D., Peters, J.A. and Braga, E.J.B., 2014, Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin production from leaves of *Alternanthera tenella*, Ciência Rural. 44: 1893-1898.
- [24] Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2007, Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root suspension cultures, Molecules 12: 607-621.