



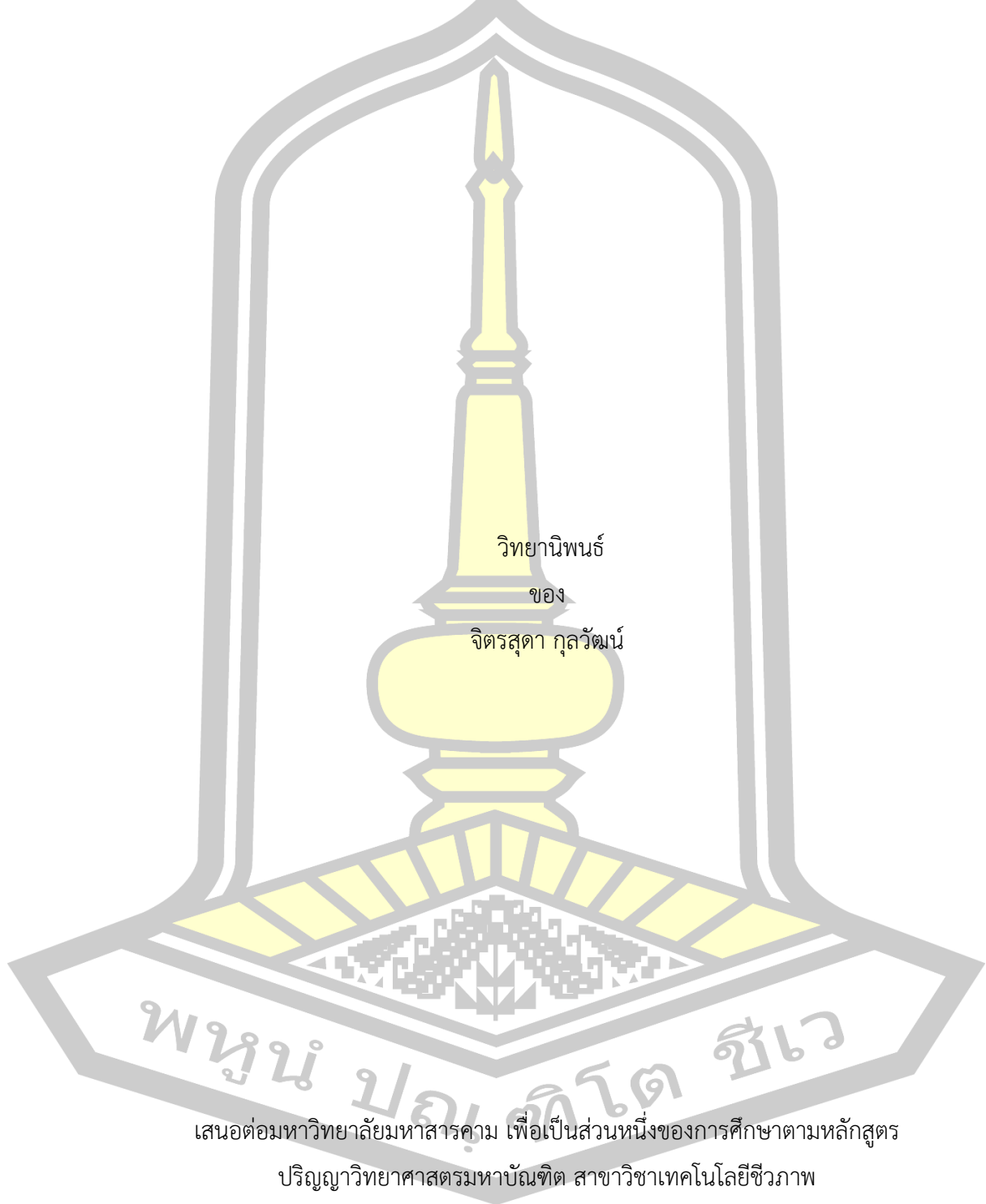
การเสริมสร้างการสังเคราะห์สารคอร์โคโรเดเซปิน อะดีโนซีน และโพลีฟีนอลในการเพาะเลี้ยงถังเช่าสีทอง
โดยใช้สารกระตุ้น

วิทยานิพนธ์
ของ
จิตรสุดา กุลวัฒน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การเสริมสร้างการสังเคราะห์สารคอร์ติเซปิน อะดีโนซีน และโพลีฟีนอลในการเพาะเลี้ยงงั่งเช่าสีทอง
โดยใช้สารกระตุ้น

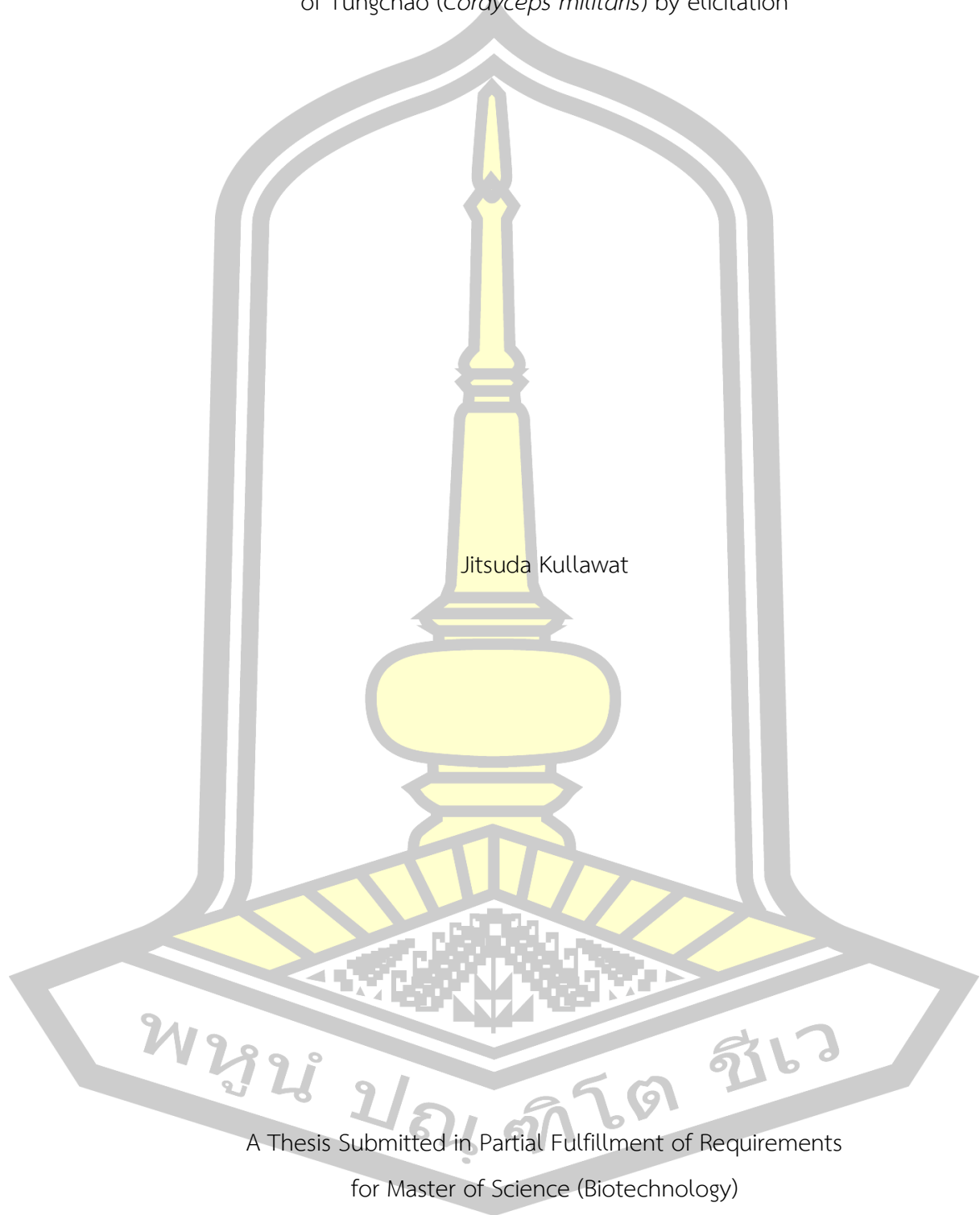


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มิถุนายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Enhancement of cordycepin, adenosine and polyphenol contents in the cultivation
of Tungchao (*Cordyceps militaris*) by elicitation



Jitsuda Kullawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

June 2021

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวจิตรสุดา กุลวัฒน์
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. พรเทพ ถนนแก้ว)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รศ. ดร. ลือชัย บุตคุป)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. พีรยา โชติถนอม)

กรรมการ

(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)

กรรมการ

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พูน บุญชาติ ชีว

ชื่อเรื่อง การเสริมสร้างการสังเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน และโพลีฟีนอลในการเพาะเลี้ยงถั้วเชื้อเห็ดโดยใช้สารกระตุ้น

ผู้วิจัย จิตรสุดา กุลวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ลือชัย บุตุคุป
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิรยา โชติถนอม

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2564

บทคัดย่อ

Cordyceps militaris หรือเห็ดถั้วเชื้อเห็ด เป็นเห็ดสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันและมูลค่าสูง สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน เป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สุดที่พบมากในเห็ดถั้วเชื้อเห็ด และยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติในการบำรุงร่างกายและต้านโรคมะเร็งทำให้เห็ดชนิดนี้มีมูลค่าสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั้วเชื้อเห็ดโดยใช้สารกระตุ้น ทำการออกแบบการทดลองทางสถิติโดยใช้ Plackett – Burman (PB) มีปัจจัยที่นำมาทำการศึกษา 7 ปัจจัย ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), ZnSO_4 (Zn^{2+}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), salicylic acid, gibberellic acid, L-phenylalanine ผลการศึกษาการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ regression analysis จากแผนการทดลองพบว่าสารทุกตัวมีผลทั้งเชิงบวกและเชิงลบต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเติม CaCl_2 CuSO_4 และ L-phenylalanine มีผลเชิงบวกสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมพบว่าสูตรอาหารที่มีการใช้สารกระตุ้นมีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดอยู่ที่ 10,071.40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สูตรอาหารทั่วไปที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นมีปริมาณสารคอร์ไดเซปิน 4,550.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงถั้วเชื้อเห็ดแก่เกษตรกรต่อไป

คำสำคัญ : ถั้วเชื้อเห็ด, คอร์ไดเซปิน, อะดีโนซีน, อิลิซิเตอร์

TITLE Enhancement of cordycepin, adenosine and polyphenol contents in the cultivation of Tungchao (*Cordyceps militaris*) by elicitation

AUTHOR Jitsuda Kullawat

ADVISORS Associate Professor Luchai Butkhop , Ph.D.
Assistant Professor Pheeraya Chottanom , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biotechnology

UNIVERSITY Maharakham **YEAR** 2021
University

ABSTRACT

Cordycepin, adenosine is one of the most important bioactive compounds produced by species of *Cordyceps militaris* . In recent years, mushrooms have become a valuable source with various bioactive ingredients with high value. This study aims to optimize and enhance cordycepin, adenosine in cultivation medium of *Cordyceps militaris* by elicitation and using Plackett–Burman (PB) design. Seven elicitors include CaCl_2 , CuSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , salicylic acid, gibberellic acid and L-phenylalanine were used to improve the production of cordycepin, adenosine in cultivation medium of *Cordyceps militaris*. Results showed that the cordycepin, adenosine production could be affected by all elicitors but that the CaCl_2 , CuSO_4 and L-phenylalanine addition had the highest effect on the *Cordyceps militaris* growth and increased cordycepin , adenosine synthesis . The maximum cordycepin production was 10,071.40 mg/kg dry weight and The information obtained is helpful for the hyperproduction of cordycepin by cultivation of *C.militaris* on a large scale.

Keyword : *Cordyceps militaris*, Cordycepin, adenosine, Elicitor

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ลือชัย บุตคุป อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ ผศ.ดร.พีรยา โชติถนอม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาชี้แนะให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขในการดำเนินงาน จนทำให้โครงการวิจัยฉบับนี้ มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้นจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทดลอง

ตลอดจนทุกคนในครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกโดยตลอดมา จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

จิตรสุตา กุลวัฒน์



สารบัญ

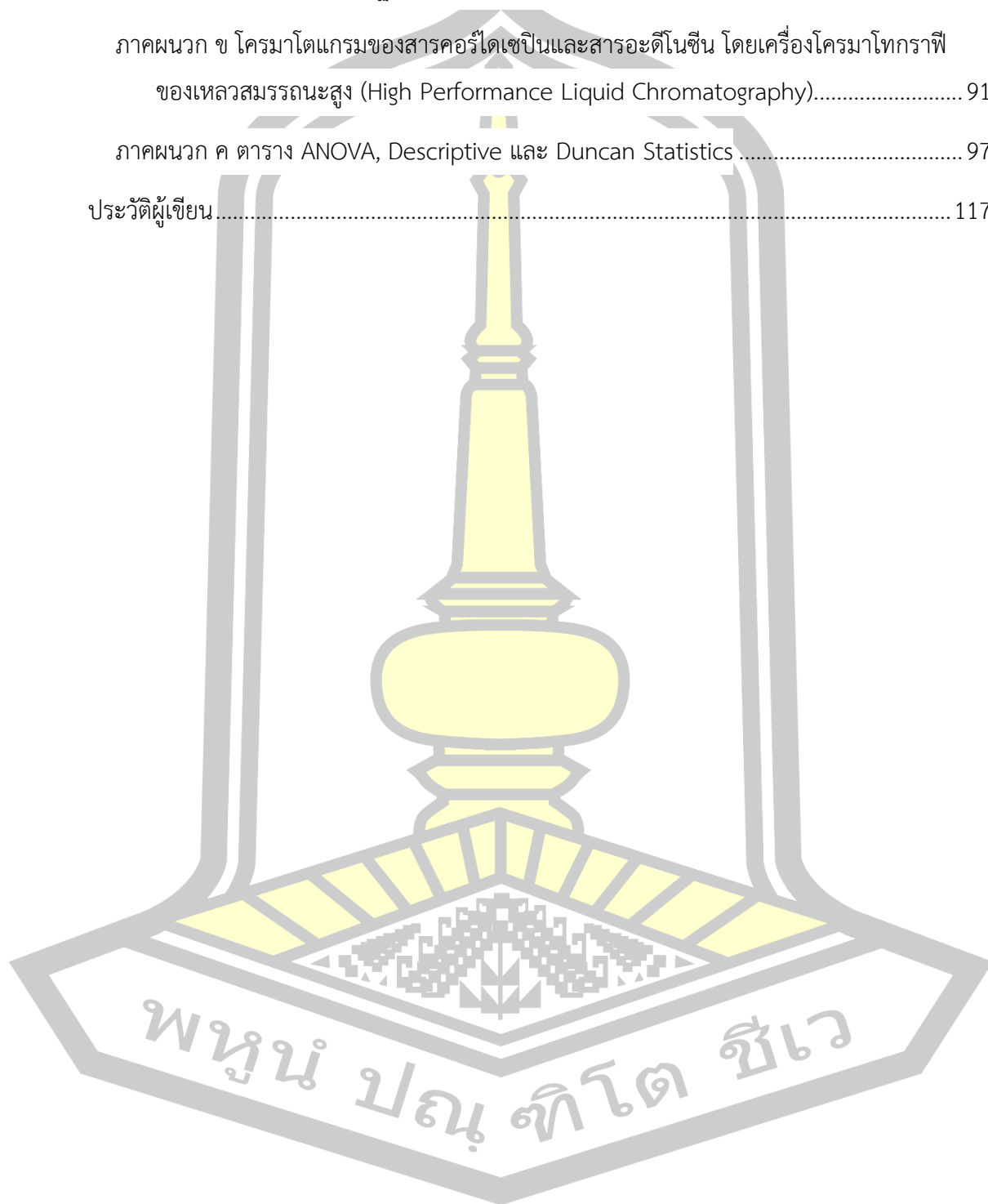
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เห็นถึงเช่า.....	4
2.1.1 วงจรชีวิตของเห็นถึงเช่า.....	5
2.1.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเห็นถึงเช่า.....	7
2.2 เห็นถึงเช่าสีทอง.....	7
2.3 การศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ และการผลิตสารต่างๆ จากเห็นถึงเช่า.....	8
2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็นถึงเช่า.....	9
2.5 การกระตุ้นและสารกระตุ้นทางเคมีและชีวภาพ.....	13
2.5.1 Elicitation.....	13
2.5.2 ตัวกระตุ้นทางเคมี เช่น สารสกัดจากพืช เกลือแร่ ฮอโมน สารที่เป็นพิษ.....	16

2.5.2 ตัวกระตุ้นจากสิ่งมีชีวิต (Biotic elicitor) เช่น ยีสต์ ฟังไจ แบคทีเรีย	20
2.6 ปัจจัยในการใช้ตัวกระตุ้น	20
2.7 การจัดการทดลอง Plackett and Burman design.....	21
2.8 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)	23
2.9 แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD).....	25
2.10 การวิเคราะห์การถดถอย.....	26
2.10.1 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย.....	27
2.10.2 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ	27
2.10.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการถดถอยเชิงพหุคูณ	28
2.11 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย	28
2.11.1 normal probability plot ของค่าคลาดเคลื่อน	28
2.11.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน.....	28
2.11.3 การทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน	29
2.11.4 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R)	29
2.11.5 การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมโดยการหาค่าเบี่ยงเบนของข้อมูล.....	29
2.11.6 เลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุด	30
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	31
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	31
3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	31
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	31
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.3 การหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design.....	33
3.4 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง	34

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....	34
3.4.2 การเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อสร้างดอกเห็ด.....	34
3.4.3 การเก็บเกี่ยวดอกเห็ด.....	35
3.5 การสกัดตัวอย่างเห็ดถึงเข้าสู่ห้อง.....	36
3.6 การวิเคราะห์.....	36
3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content).....	37
3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content).....	37
3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine.....	37
3.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	38
3.6.4.1 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity).....	38
3.6.4.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	39
3.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในดอกเห็ดถึงเข้าสู่ห้องโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design.....	39
3.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	39
3.8.1 การสกัด.....	39
3.8.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง.....	40
3.8.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Resazurin reduction microplate assay.....	40
3.8.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	41
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง.....	42
4.1 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ห้อง โดย Plackett-Burman design. 42	
4.1.1 ผลของการใช้สารกระตุ้นต่อรูปร่าง ความยาว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของเห็ดถึงเข้าสู่ห้อง.....	42
4.1.2 ผลของการใช้สารกระตุ้นต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน.....	44

4.1.3 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด.....	46
4.1.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	46
4.1.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ.....	47
4.2 ผลของสารสกัดหยาบ <i>Cordyceps militaris</i> ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง.....	54
4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ การสร้างสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	56
4.4 การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลเบื้องต้น.....	60
4.5 สหสัมพันธ์สำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP) ของการ เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น.....	64
4.6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพล ร่วมของสารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น.....	70
4.6.1 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	71
4.6.2 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	72
4.6.3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	74
4.6.3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging.....	76
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	79
ข้อเสนอแนะ.....	80
บรรณานุกรม.....	81

ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Cordyceps militaris</i>	89
ภาคผนวก ข โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน โดยเครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography).....	91
ภาคผนวก ค ตาราง ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics	97
ประวัติผู้เขียน.....	117



สารบัญตาราง

	หน้า
Table 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	11
Table 2 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นทางกายภาพ ได้แก่ แสง ความเครียดออกซิเดทีฟ ความเค็ม และ อุณหภูมิ.....	15
Table 3 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นทางเคมี เช่น สารสกัดจากพืช กลีโบริน ฮอริโมน สารที่เป็นพิษ.....	18
Table 4 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นจากสิ่งมีชีวิต (Biotic elicitor) เช่น ยีสต์ ฟังไจ แบคทีเรีย.....	19
Table 5 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง.....	22
Table 6 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัยโดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง.....	23
Table 7 ค่าของ crowde level ใน Central Composite Design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย.....	26
Table 8 ปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาโดยใช้ Plackett-Burman design.....	33
Table 9 การจัดการทดลอง Plackett-Burman design ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็งสร้างดอกเห็ด.....	34
Table 10 ผลของสารกระตุ้นต่อความยาว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	44
Table 11 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารคอร์โดเซปินและสารอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	45
Table 12 ผลของสารกระตุ้นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	47
Table 13 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (regression analysis) แผนการทดลอง Plackett-Burman design สำหรับปริมาณคอร์โดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ 7 ชนิด.....	48

Table 14 ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (regression analysis) แบบแผนการทดลอง (Plackett-Burman design) สำหรับปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารกระตุ้น ชนิดต่าง ๆ 7 ชนิด.....	48
Table 15 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA จากแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design.....	51
Table 16 คะแนนผลรวมเชิงบวกของตัวแปรต่างๆ จากแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design สำหรับการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น	52
Table 17 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดเหยาบ Cordyceps militaris ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ.....	54
Table 18 ปัจจัยและระดับปัจจัยในการทดลอง.....	57
Table 19 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง	57
Table 20 ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารคอร์โดเซปิน อะดีโนซีน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ	58
Table 21 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณสารคอร์โด.....	65
Table 22 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของสารอะดีโนซีน ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง	66
Table 23 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง	67
Table 24 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟลาโวนอยด์ ทั้งหมดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง	68
Table 25 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%scavenging) ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง	69
Table 26 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง	70
Table 27 Descriptive ปริมาณสารคอร์โดเซปิน สารอะดีโนซีน การเจริญ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง	98
Table 28 แสดง ANOVA ปริมาณสารคอร์โดเซปิน อะดีโนซีน การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง	105

Table 29 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารคอร์ไคเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	106
Table 30 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	107
Table 31 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง	108
Table 32 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง....	109
Table 33 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง	110
Table 34 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.111	111
Table 35 แสดงตาราง Duncan ปริมาณน้ำหนัสดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	112
Table 36 แสดงตาราง Duncan ปริมาณน้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	113
Table 37 แสดงตาราง Duncan ปริมาณผลผลิตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	114
Table 38 แสดงตาราง Duncan ความยาวดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	115
Table 39 แสดงตาราง Duncan ปริมาณดอกทั้งหมดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	116



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
Figure 1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า.....	6
Figure 2 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ.....	6
Figure 3 รูปร่าง stromata แบบ capitate.....	7
Figure 4 ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	8
Figure 5 โครงสร้างทางเคมีของสารคอร์โดเซปิน (A) และสารอะดีโนซีน (B).....	11
Figure 6 แสดงการจัดจำแนกชนิดของตัวกระตุ้น.....	13
Figure 7 โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย.....	24
Figure 8 Central Composite Design (CCD) a สำหรับ k = 2 ปัจจัย 6 สำหรับ k = 3 ปัจจัย..	25
Figure 9 แผนผังการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง.....	32
Figure 10 สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าเพื่อให้เกิด Fruiting body.....	36
Figure 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	43
Figure 12 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์โดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC.....	46
Figure 13 วิถีชีวสังเคราะห์ของสารคอร์โดเซปินและสารอะดีโนซีน.....	50
Figure 14 ผลของสารสกัด Cordyceps militaris จากตัวทำละลายที่แตกต่างกันต่อการอยู่รอดของ เซลล์มะเร็ง, A-B; เซลล์มะเร็ง MCF-7, C-D; เซลล์มะเร็ง HepG2 และ E-F; เซลล์มะเร็ง HeLa แต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM ของการทดลองสามครั้ง p < 0.05 เทียบกับตัวควบคุม.....	55
Figure 15 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของ (A) ปริมาณสารคอร์โดเซปิน (B) ปริมาณ สารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่า.....	61
Figure 16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของ (A) ปริมาณสารคอร์โดเซปิน (B) ปริมาณ สารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	62

Figure 17 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย ของ (A)ปริมาณสารคอร์โดเซปิน (B)ปริมาณสารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 63

Figure 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 71

Figure 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 72

Figure 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง 72

Figure 21 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 73

Figure 22 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 73

Figure 23 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง..... 74

Figure 24 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 75

Figure 25 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด..... 75

Figure 26 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด..... 75

Figure 27 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging..... 76

Figure 28 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging77

Figure 29 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging	77
Figure 30 ลักษณะดอกและความยาวของดอกที่ติดั่งเข้าสีทองเจริญเต็มวัย.....	90
Figure 31 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine).....	92
Figure 32 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 1.....	92
Figure 33 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 2.....	93
Figure 34 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	93
Figure 35 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 4.....	93
Figure 36 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	94
Figure 37 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 6.....	94
Figure 38 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	94
Figure 39 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	95
Figure 40 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	95
Figure 41 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	95
Figure 42 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	96
Figure 43 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)..	96

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเห็ดผสมไมโครที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่คุณค่าสูง (Smith, Rowan, and Sullivan 2002; Wasser and Weis 1999) มีถิ่นกำเนิดอยู่มากมายหลายแหล่ง ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) จัดเป็นเห็ดในกลุ่ม Ascomycetes Dong Chong Xia Cao ที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารบำรุงกำลังและถือได้ว่าเป็นเห็ดที่มีฤทธิ์เป็นยาที่สำคัญในทวีปเอเชีย (Ying *et al.*, 1987) คนโบราณใช้เป็นยาอายุวัฒนะและรักษาโรคมานานนับพันปี ช่วยปรับสมดุลต่างๆ ในร่างกายให้เป็นปกติ ช่วยเพิ่มพลังงาน กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และมีคุณสมบัติที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยา มีงานวิจัยสนับสนุนมากมาย มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญหลายชนิด เช่น สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และอะดีโนซีน (adenosine) สาร cordycepin (3'-deoxyadenosine) เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มนิวคลีโอไซด์ (nucleoside antibiotics) ที่ออกฤทธิ์ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Cunningham *et al.*, 1950) จากผลการศึกษาในปัจจุบันพิสูจน์ให้เห็นแล้วว่าสาร cordycepin มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายประการ ได้แก่ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunological regulation) (Zhou *et al.*, 2002; Noh *et al.*, 2009; De Silva *et al.*, 2013) ต้านไวรัส (antivirus) (Hashimoto and Simizu 1976a) ต้านภาวะการมีไขมันสูง (antihyperlipidemia) (De Silva *et al.*, 2013) ต้านเชื้อรา (antifungus) (Sugar and McCaffrey, 1998) ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว (antileukemia) (Thomadaki *et al.*, 2008; Kodama *et al.*, 2000; De Silva *et al.*, 2013) ต้านมะเร็ง (anticancer) (Yoshikawa *et al.*, 2008) นอกจากนี้เห็ดถั่งเช่าสีทองยังมีนิวคลีโอไซด์ (Nucleosides) มากกว่า 10 ชนิด ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี (Das *et al.*, 2010; ัญญา ทะพิงค์แก 2555) ถั่งเช่าได้รับการวิจัยแล้วว่าเป็นเชื้อราที่ไม่มีพิษต่อผู้บริโภค (Huang *et al.*, 1987)

การหาสภาวะอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถปรับปรุงการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ ปัจจัยต่างๆ เช่น pH แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น และอุณหภูมิ และสารอิลิซิเตอร์ (elicitors) ในการเพาะเลี้ยงมีผลในการสร้างสารทุติยภูมิและชีวมวลของเห็ด ในจำนวนนี้สารอิลิซิเตอร์ คือสารประกอบที่สามารถกระตุ้นให้สิ่งมีชีวิตสามารถสร้างสารทุติยภูมิเพื่อต่อสู้หรือป้องกันตัวเองได้ โดยสารอิลิซิเตอร์จะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ในวิถีชีว

สังเคราะห์ทำงาน (Aijaz, Jain, and Hariharan 2011; Angelova, Georgiev, and Roos 2006; Patel and Krishnamurthy 2013; Zhao, Davis, and Verpoorte 2005) ได้มีการนำสารอิลิซิเตอร์มาใช้ในการกระตุ้นชีวสังเคราะห์ของเห็ดหลินจือ (Liang *et al.*, 2010) (Zhu *et al.*, 2010) (Fan, Wang, and Jiang 2012) ได้ศึกษาการเติมแร่ธาตุต่างๆ (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} และ Fe^{2+}) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือสามารถกระตุ้นการสร้างสาร cordycepin ซึ่งในจำนวนนี้ Fe^{2+} มีประสิทธิภาพมากที่สุด ขณะที่ Zn^{2+} กลับทำให้การสร้าง cordycepin ลดลง นอกจากนี้ (Gu *et al.*, 2007) พบว่าการเติม 0.1 mM Mn^{2+} สามารถกระตุ้นการสร้างสังเคราะห์สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ ได้แก่ adenosine และ guanosine ซึ่งเป็นประโยชน์ในการสังเคราะห์สาร cordycepin ของเห็ดหลินจือ

ปัจจัยที่ส่งผลในการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญในเห็ดหลินจือมีหลายปัจจัยดังที่กล่าวมาเบื้องต้น ด้วยปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ซึ่งมีมากมายหลายปัจจัยจึงจำเป็นต้องใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติมาประยุกต์ใช้ วิธีทางสถิติแบบดั้งเดิมการวิเคราะห์ทีละปัจจัย (one-factor-at-a-time; OFAT) ได้มีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลของปัจจัยได้ทีละปัจจัยในการออกแบบการทดลองในระหว่างการเพาะเลี้ยงเห็ด (Cheng *et al.*, 2010) แม้ว่าเทคนิคนี้เป็นวิธีการที่ง่ายในการติดตามอิทธิพลของตัวแปรต่าง ๆ ที่ต้องการศึกษาแต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานานกว่าจะศึกษาครบทุกปัจจัย สิ้นเปลืองทรัพยากร และค่าใช้จ่ายสูง (Bezerra *et al.*, 2008) นอกจากนี้วิธีการ OFAT ยังไม่สามารถตรวจสอบการมีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยว่ามีอิทธิพลร่วมกันหรือไม่ ดังนั้นการเลือกใช้สถิติที่ถูกต้องเหมาะสมที่สามารถศึกษาได้ทีละหลายๆ ปัจจัยจึงเป็นสิ่งที่ดีกว่า วิธี Response surface methodology (RSM) เป็นสถิติที่อาศัยการศึกษาความสัมพันธ์แบบสหสัมพันธ์ของหลายองค์ประกอบ (polynomial regression model) ที่ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการพิจารณาตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่มีปฏิสัมพันธ์กันได้ RSM ประกอบด้วยสามขั้นตอน (1) การออกแบบการทดลองเพื่อสกัดปัจจัย (2) การประเมินโมเดลสัมประสิทธิ์ของหลายองค์ประกอบ และ (3) การทำนายโมเดลตอบสนองและการได้มาซึ่งค่าที่เหมาะสม Box-Behnken design (BBD) และ central composite design (CCD) เป็นชนิดของ RSM ที่ได้รับความนิยมมากที่สุด BBD สามารถใช้ได้ดีกับวิธี CCD เมื่อมี 3 ปัจจัยในการศึกษาที่ต้องการลดจำนวนการทดลองลง (Wu *et al.*, 2016; Cheng, Ren and Ogden, 2013)

ด้วยคุณภาพชีวิตของผู้คนในยุคปัจจุบัน การรักสุขภาพสูงขึ้นจึงทำให้มีความต้องการสาร cordycepin สูงขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากเห็ดหลินจือมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อแหล่งอาหารที่เจริญสภาวะการเจริญมีความเฉพาะตัว ฤดูกาลในการเก็บมีจำกัด ประกอบกับสภาวะอากาศของโลกที่เปลี่ยนแปลงจึงทำให้เห็ดหลินจือเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Das *et al.* 2010; Paterson 2008) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเห็ดหลินจือที่มีจากแหล่งธรรมชาติจึงมีขีดจำกัดไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพให้พอเพียงต่อความต้องการของผู้บริโภคได้ จึงจำเป็นต้องในการค้นหาวิธีใน

การเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองที่สามารถเพิ่มการสังเคราะห์สาร cordycepin ได้สูง ถึงแม้ว่าสาร cordycepin จะสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการทางเคมีก็ตามแต่กระบวนการสังเคราะห์ก็มีความสลับซับซ้อน และต้องมีการปล่อยตัวทำละลายอินทรีย์ทิ้งจำนวนมากซึ่งก็ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพมนุษย์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในปัจจุบันมีอุตสาหกรรมการผลิตน้อยมาก (Hansske and Robin, 1985; Aman *et al.*, 2000) รายงานการศึกษาในปัจจุบันชี้ให้เห็นแล้วว่าการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองทั้งแบบอาหารแข็งและอาหารเหลวสามารถใช้ผลิต cordycepin ได้ (Park *et al.*, 2001)

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1 ศึกษาอิทธิพลของอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของสาร cordycepin, adenosine, polyphenols และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลต่อสาร cordycepin, adenosine, polyphenols และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยประยุกต์ใช้สถิติ Response surface methodology (RSM)

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง ทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Salicylic acid, Gibberellic acid, L-phenylalanine

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สูตรอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.4.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

พจน บณ ภัโต ชิว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดถั่งเช่า

ถั่งเช่า (ถั่ง = หนอน เช่า = หญ้า) หรือที่เรียกว่า “หญ้าหนอน” เนื่องจากในฤดูหนาวเป็นหนอน ในฤดูร้อนเป็นหญ้า พบบนที่ราบสูงทิเบต ตัวหนอนของผีเสื้อค้ำคาวหรือผีเสื้อกะโหลก (*Hepialus armoricanus*) จะเจริญเติบโตอยู่ใต้ผิวดินบนภูเขาที่ปกคลุมด้วยหิมะ โดยมีสปอร์ของเชื้อเห็ดรา (*Ophiocordyceps sinensis*) กระจายอยู่ทั่วไป เมื่อหิมะละลายสปอร์จะไหลไปกับน้ำและซึมลงใต้ผิวดิน เมื่อหนอนกินสปอร์ของเชื้อ เห็ดชนิดนี้เข้าไปสปอร์ก็จะงอกเป็นเส้นใยเจริญเติบโตบนตัวหนอน เมื่อฤดูใบไม้ผลิมาถึงอุณหภูมิสูงขึ้น เส้นใยรวมตัวหนาแน่นขึ้นก็จะแทงออกจากปากตัวหนอนที่ตาย แล้วแข็งเป็นมัมมี่ ออกเป็นดอกเห็ดมีลักษณะเหมือนหญ้างอก โผล่เหนือพื้นดินเพราะต้องการแสงกลายเป็นชุมทองของชาวทิเบตเพราะอาจขายได้ถึงตัวละ 750 บาท หญ้าหนอนมีการค้นพบแล้วมากกว่า 300 ชนิด แต่มีไม่กี่ชนิดที่มีสารออกฤทธิ์หรือสารสำคัญ ซึ่งมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ในเอเชียมีการค้นพบที่เขตปกครองพิเศษทิเบต จีน เนปาล ภูฏาน เกาหลี เวียดนามและไทย ถั่งเช่าที่มีชื่อเสียง มีอยู่ 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis*) หรือชื่อเดิม *Cordyceps sinensis* เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เห็ดถั่งเช่าหิมะ (ถั่งเช่าเกาหลี) (*Isaria tenuipes*) หรือชื่อเดิม *Paecilomyces tenuipes* เห็ดถั่งเช่าจ๊กจั่น (ว่านจ๊กจั่น) (*Isaria sinclairii*) หรือชื่อเดิม *Paecilomyces cicadae*

เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ที่มีชื่อเสียงมากที่สุด คือ เห็ดถั่งเช่าทิเบต หรือเห็ดถั่งเช่าแท้ *Ophiocordyceps sinensis* หรือชื่อเดิม *C. sinensis* ในภาษาจีนจะ เรียกว่า “ตั้งถั่งเช่า หรือ ตั้งถั่งเช่า” แต่ถ้าเรียกว่า “ถั่งเช่า หรือถั่งเช่า” จะหมายถึงเห็ดถั่งเช่าสีทอง เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือเห็ดถั่งเช่าเกาหลี *C. militaris*, *Isaria tenuipes* หรือ *Isaria japonica* ตามลำดับ หรือตัวอื่น ๆ ได้ (Zhou et al., 2009)

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps*) เป็นฟังไจชั้นสูงจัดอยู่ในกลุ่มของแอสคอฟังไจ (*sac fungi*) ในระยะที่มีการสืบพันธุ์จะสร้าง ascocarp แบบ perithecepium เป็นกลุ่มรวมกันอยู่บนโครงสร้างที่เรียกว่า stroma ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งจั่นสนี้ตั้งขึ้นตามลักษณะของ stroma ที่มีส่วนปลายยอดพองออกเป็นกระเปาะ ดำรงชีวิตแบบพาราสิต มีประมาณ 300 สปีชีส์ อาศัยอยู่ทั่วโลกพบมากบริเวณป่าเขตร้อนที่มีความชื้นหรือในช่วงฤดูฝน ส่วนใหญ่เป็นพาราสิตบนตัวอ่อนดักแด้และตัวเต็มวัย

ของแมลง เช่น ผึ้ง มด มวน ตัวง ต่อ และผีเสื้อ เป็นต้น มีไม่กี่สปีชีส์ที่พบบนแมงมุมและบน ascocarp ที่อยู่ใต้ดินของเห็ด

โดยทั่วไปเห็ดถั่งเช่ามักจะเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นฟังไจในกลุ่มที่เรียกว่า insect fungi เนื่องจากส่วนใหญ่ที่พบในจีนนั้นจะเป็นสปีชีส์ที่เจริญบนแมลง นั่นเอง Ascocarp จะเข้ามาทำลายแมลงที่เป็น host โดย ascocarp ที่ไปตกหรือสัมผัสกับตัวแมลงจะสร้าง germ tube ผ่านผ่านผิวหนังนอกของแมลงโดยการย่อยสลายไคติน เส้นใยจะเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ภายใน hemocoel ของแมลงหลังจากแมลงตายเส้นใยจะรวมตัวกันกลายเป็น sclerotium อัดแน่นจนเต็มอยู่ภายในร่างกายของแมลง ซึ่งแมลงในตอนนี้จะมีลักษณะคล้ายมัมมีเหลือเพียงเปลือกหุ้มชั้นนอกเท่านั้น เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม sclerotium จะพัฒนาไปเป็น stroma เจริญออกมาบนผิวหนังนอกของแมลงที่เป็น host เมื่อ stroma เจริญเติบโตเต็มที่และ ascocarp ก็จะถูกปล่อยออกไปจากนั้นก็สลายไป ซึ่งซากของแมลงที่เหลืออยู่ก็จะมีการสร้าง stroma ขึ้นมาใหม่ได้อีก

แหล่งที่พบเห็ดถั่งเช่า แตกต่างกันไปตามแหล่งอาศัยของเจ้าบ้าน (host) ซึ่งอาจจะฝังอยู่ในดิน ซากพืชที่ทับถม หรือไม้ผุ สปีชีส์ที่พบตามพื้นดิน เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนหนอนผีเสื้อจะสร้าง stroma ที่มีก้านชูขึ้นมาเหนือพื้นดิน ส่วนใหญ่พบในฤดูฝน เนื่องจากฟังไจต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโตเพื่อเจริญผ่านชั้นดินขึ้นมา สปีชีส์ที่เจริญบนแมลงที่อาศัยอยู่ตามผิวหนังด้านข้างขึ้นไป เช่น สปีชีส์ที่เจริญบนมวน มด ต่อ และผึ้ง ก็จะพบตามผิวหนังด้านข้างเดียวกัน โดยที่ stroma ไม่ได้เจริญผ่านชั้นดินขึ้นมาแต่จะเจริญผ่านชั้นของใบไม้ที่คลุมแมลงอยู่ ส่วนสปีชีส์ที่พบตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แมลงอาศัยอยู่มักจะพบได้ตลอดทั้งปี โดยส่วนใหญ่พบได้ตามต้นไม้เนื่องจากแมลงจะอาศัยอยู่เพื่อการพลางตัวเองจากศัตรูตามธรรมชาติ อีกทั้งยังเป็นการกำบังตัวเองจากสภาพแวดล้อม เห็ดถั่งเช่าที่อยู่บนตัวอ่อนของจิ้งจั่นก็เป็นอีกสปีชีส์ที่ใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาหัดเกร็งของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง หรืออาการชักในเด็กนิยมใช้กันมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บางสปีชีส์ที่เจริญบนเห็ด truffle จีนัส Elaphomyces เช่น *C. ophioglossoides* ก็มีรายงานถึงคุณสมบัติทางยาสมุนไพรเช่นกัน โดยใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ช่วยในการหมุนเวียนโลหิต และควบคุมการมีรอบเดือนให้เป็นปกติ นอกจากนี้เป็นยาสมุนไพรแล้วเห็ดถั่งเช่าบางสปีชีส์ยังมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูพืชบางชนิด เช่น ในประเทศแทนซาเนียพบว่าตัวอ่อนของด้วงชนิดหนึ่งที่เข้าทำลายระบบรากของต้นอ้อยและก่อปัญหาของการผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นอย่างมาก *C. barnesii* เจริญอยู่จึงมีความสนใจที่จะนำ *C. barnesii* ไปใช้ในการควบคุมตัวอ่อนของด้วงชนิดนี้ในไร้อ้อย และเนื่องจากเห็ดถั่งเช่ามีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงจึงน่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารเคมี

2.1.1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

การที่ราแมลงได้ปนเปื้อนเข้าไปในวงจรชีวิตของแมลงอาจเกิดจากสปอร์ราตกลงบนตัวของแมลง หรืออาจจากการที่แมลงกินอาหารที่ปนเปื้อนราเข้าไป เส้นใยของราจะฝังตัวเข้าสู่อวัยวะภายใน

และเจริญเติบโตอยู่ในเจ้าบ้าน (ตัวแมลง) ด้วยการกินอาหารจากตัวแมลงนั้น หลังจากนั้นราที่เป็นปรสิตนี้จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว จนสามารถเข้าไปแทนที่อยู่ในลำตัวของแมลงนั้นทั้งตัว และกลายเป็นกลุ่มเส้นใยของรา หรือว่าไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยของราแมลงเมื่อเจริญเติบโตรวมตัวกัน เกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่กลายเป็นดอกเห็ด มีรูปร่างและสีที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นก้านสปอร์ราที่เหมือนกิ่งไม้ หรือเหมือนกับตาข่ายคลุมตัวแมลง ก้านสปอร์ก็พร้อมที่จะกระจายสปอร์ไปตกบนแมลงเป้าหมายตัวต่อไป ดังแสดง

เห็ดถั่งเช่ามีหลายชนิดด้วยกัน ดังแสดงในภาพที่ 2.2 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ที่มีชื่อเสียงมากที่สุดคือ เห็ดถั่งเช่าทิเบต หรือเห็ดถั่งเช่าแท้ *Ophiocordyceps sinensis* หรือชื่อเดิม *C. sinensis* (Zhou *et al.*, 2009)



Figure 1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

ที่มา : <https://tangchowthai.com>

สืบค้นวันที่ 26 พฤษภาคม 2561



Figure 2 เห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ

ที่มา: ธีัญญา ทะพิงค์แก (2555)

2.1.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดถั่งเช่า

Stromata เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย เจริญออกมาจากแมลง แมงมุม หรือเห็ด truffle ที่ฝังอยู่ใต้ดิน อาจเกิดอยู่เดี่ยว ๆ หรือมีหลาย Stromata ลักษณะอ่อนนุ่ม บางครั้ง อาจพบที่มีลักษณะแข็งบ้าง แต่ก็มีความแข็งไม่มากนัก มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ ทรงกระบอก ทรงกระบอกปลายป่อง คล้ายกระบอง หรือคล้ายกระบองปลายบาน เป็นต้น ก้านมักจะเป็นครบออก ทรงตรง หรือโค้งงอ บางครั้งมีการแตกแขนง ส่วนที่ใช้ในการสืบพันธุ์อยู่ด้านบนลักษณะพองออก ขนาดใหญ่กว่าส่วนก้าน เป็นที่เกิดของ perithecia รูปร่างแบบทรงกระบอกสั้น คล้ายกระบองรูปไข่ เกือบกลมหรือมีรูปร่างไม่แน่นอน ผิวมักจะหยาบ หรือเป็นปุ่มเล็ก ๆ เกิดจากส่วนของ perithecia ที่ยื่นออกมาหรือบางครั้งอาจมองเห็นเป็นหลุมเล็ก ๆ มีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง ไปจนถึงสีน้ำตาลหรือดำ บางสปีชีส์ส่วนของก้านอาจจะมีสีแตกต่างกัน ขนาดของ Stromata แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอายุของสปีชีส์และขนาดของ host ที่เป็นแหล่งอาศัย ดังแสดงในภาพที่ 3

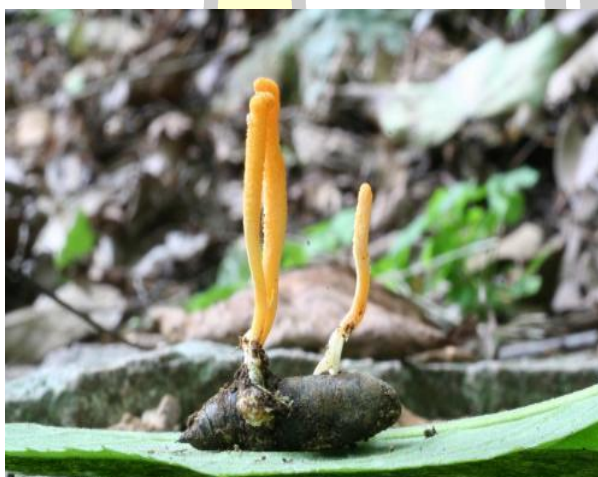


Figure 3 รูปร่าง stromata แบบ capitate
ที่มา: <http://cordyceps.cgrb.oregonstate.edu>

2.2 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นราแมลง (entomofungus) ในกลุ่มแอสโคมายซีต (Ascomycetes) ในจีนัส *Cordyceps* โดยพบในแมลงเจ้าบ้านหลายชนิด เช่น มด ผี ต่อ แตน แมงมุม เพลี้ย ตัวง แมลงปอ ผีเสื้อ และหนอน เป็นต้น ถั่งเช่าสีทองมี stroma รูปร่างคล้ายกระบอง สีแดงส้ม ดังแสดงในภาพที่ 3 เจริญบนตัวอ่อนหรือดักแด้ของผีเสื้อ พบได้ทั่วไป สปีชีส์นี้ถูกเรียกว่า *militaris* เนื่องจากมี stroma ลักษณะตั้งตรงมองดูคล้ายกับทำยีนของทหาร (Alexoplulos

et al.,1996) เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นเชื้อราแมลงที่สามารถรับประทานได้และไม่เป็นอันตรายกับมนุษย์ (Sung et al., 2007)

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีลำดับชั้นทางอนุกรมวิธานดังนี้

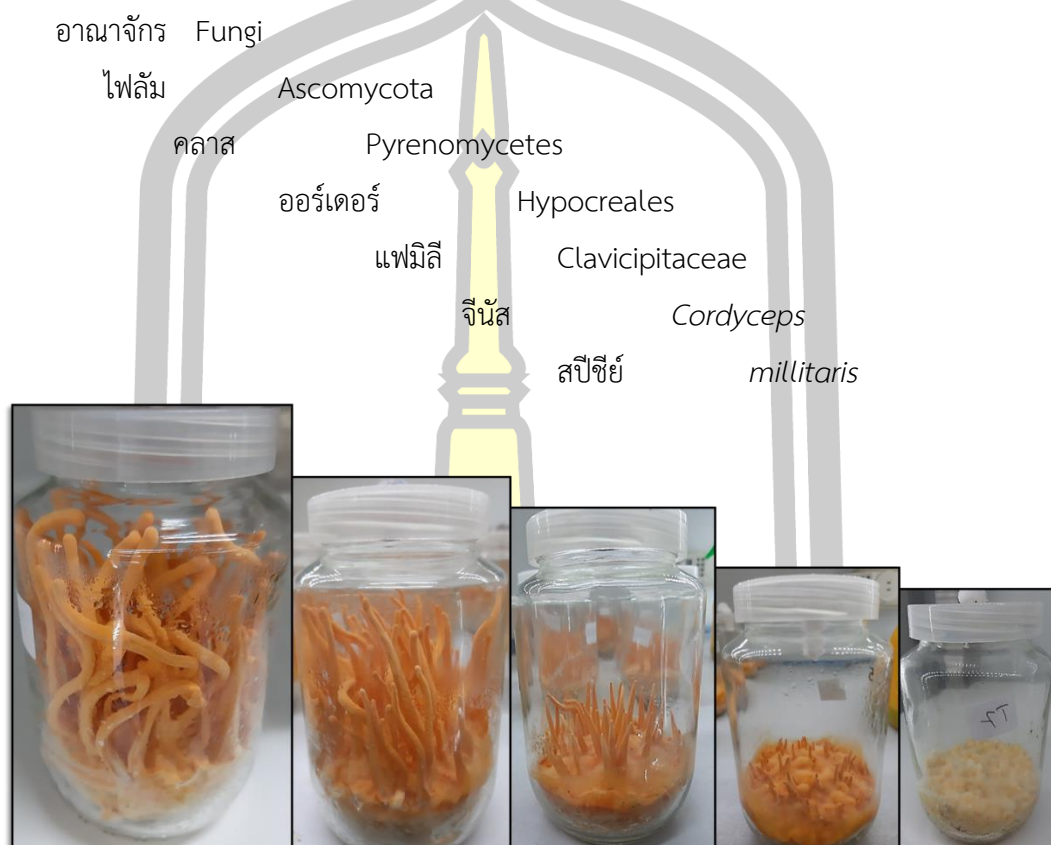


Figure 4 ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.3 การศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ และการผลิตสารต่างๆ จากเห็ดถั่งเช่า

โดยทั่วไปฟังไจที่เป็นพาราสิตจะเจริญและสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์อย่างอิสระบน host ที่เป็นแหล่งอาศัยแต่มีหลายชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวมทั้งเห็ดถั่งเช่าดังจะเห็นได้จากการทดลองของ (Wang et al.,1989) ที่ได้ทดลองการเพาะเห็ดถั่งเช่า 7 สปีชีส์ ได้แก่ *C. aphodii*, *C. gracillis*, *C. memorabilis*, *C. militaris*, *C. sobolifera*, *C. sphingum* และ *Cordyceps* sp. พบว่าเห็ดถั่งเช่าทุกสปีชีส์เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ขณะที่รายงานของ (Hywel-Jones et al.,1994) นำเห็ดถั่งเช่าซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในตัวอ่อนของผีเสื้อมาเพาะบนอาหารที่อุณหภูมิ 22 °C ในที่มีตพบว่ามีเส้นใยบริสุทธิ์สามารถเจริญได้เช่นเดียวกันแต่ไม่มีการสร้าง ascospore จากการศึกษาของ (Hodge et al.,1996) รายงานไว้ว่า *C. subsessilis* ส่วน

ใหญ่จะเจริญอยู่บนซากแมลงซึ่งต้องการสารอาหารบางอย่างจากแมลงในการเจริญเติบโต จากผลการทดลองดังกล่าว (Sung *et al.*, 2007) จึงได้มีการเลี้ยงเห็นประโยชน์จากเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่า จึงได้นำ stroma ของเห็ดถั่งเช่า 2 สปีชีส์ คือ *C. militaris* และ *C. nutans* แยกเชื้อบริสุทธิ์พบว่าเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่าทั้งสองสปีชีส์เจริญได้ดีบนอาหาร water agar และยังได้ทดลองนำเชื้อบริสุทธิ์ข้างต้นมาเพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหารที่ประกอบไปด้วยแป้งข้าวเจ้า 5 กรัม แป้งข้าวสาลี 5 กรัม ผสมกับน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าเส้นใยจะเจริญได้ดี ดังนั้น (Sung *et al.*, 2007) จึงได้เกิดแนวคิดที่จะทดลองเลี้ยง *C. militaris* ในอาหารที่มีข้าวและดักแด้ของแมลงเป็นส่วนประกอบ พบว่าหลังจากการเพาะเชื้อเป็นเวลา 60 วัน จะมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่มี perithecia เกิดอยู่บน stroma ซึ่งสร้างอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถสังเกตเห็น asci จำนวนมากถูกปล่อยออกมาจาก perithecia ภายใต้อ่างจลทรรศน์

นอกจากจะเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดถั่งเช่ายังมีประโยชน์ในการสร้างสารเมตาโบไลต์หลายชนิด เช่น cordycepin สร้างโดย *C. militaris* เป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้และยังนำไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพในการต่อต้านการเกิดเนื้องอกได้อีกด้วยสาร polysaccharide (CS-F30) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใย *C. sinensis* ในอาหารเหลว มีคุณสมบัติช่วยลดระดับ cholesterol ในเลือดได้ สาร Rythrostominone, deoxyerythrostominone, 4-O-methylerythrostominone, epierythrostominol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม naphthoquinones ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth สารประกอบทั้งหมด 6 ชนิดนี้มีผลในการต่อต้านเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง นอกจากนี้ Cordyceps บางสปีชีส์ยังมีความสามารถในการสร้างสารประกอบชนิดใหม่ขึ้นอีกด้วย เช่น *C. pseudomilitaris* สร้างสาร cordyanhydrides A และ B สารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ (Das *et al.*, 2010) รายงานไว้ว่าสารเมตาโบไลต์ที่ *C. militaris* สร้างขึ้นยังมีฤทธิ์ต่าง ๆ อีกมากมาย เช่น เสริมสมรรถนะทางเพศ ต้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ ชะลอความชรา ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว และปรับระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

2.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่า

องค์ประกอบที่พบในเห็ดถั่งเช่าพบสารต่าง ๆ ที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อการสร้างองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตโดยในเห็ดทั่วไปมักมีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 16-28 ไขมันร้อยละ 5 โปรตีนร้อยละ 59 โปรตีนร้อยละ 7-8 และเถ้าร้อยละ 1.8 (Mua *et al.*, 2001) และสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ และมีกลุ่มของสารอินทรีย์ที่น่าสนใจ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ เช่น betaglucan, galactomannan, นิวคลีโอไทด์ เช่น adenosine, cordycepin, cordycepic acid, กรดอะมิโน

สเตอรอล เช่น ergosterol, beta-sitosterol นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารสำคัญอื่น ๆ เช่น โปรตีน วิตามินต่าง ๆ เช่น E, K, B1, B2 และ B12 และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และซีลีเนียม เป็นต้น ซึ่งจากงานวิจัยจากการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีซึ่งออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในปัจจุบันพบมากกว่า 50 ชนิด

Cordycepin เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในเห็ดถั่งเช่าเป็น nucleoside ชนิด 3'-Deoxyribose ที่พบในธรรมชาติจาก *C. militaris* ประกอบด้วยน้ำตาล pentose ต่อกันเป็น กิ่งก้านสาขา มีการศึกษาการสังเคราะห์ cordycepin โดยวิธี Biosynthesis พบว่ามีการเติม Adenosine-U-C¹⁴ ลงไปในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในเชื้อ *C. militaris* มีการสังเคราะห์ cordycepin อย่างรวดเร็ว ปริมาณ cordycepin ที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการถูกเปลี่ยนจาก Adenosine Cordycepin มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ KB cell culture *B. subtilis* เซลล์มะเร็งในสัตว์ปีก และเซลล์มะเร็ง "Ehrlich ascites carcinoma" ในตัวไร แต่ไม่เคยมีรายงานว่า มีผลต่อระบบเนื้อเยื่อของสัตว์อื่น ๆ มีรายงานการสังเคราะห์ cordycepin โดยวิธี Chemical synthesis ในปี ค.ศ. 1960 โดย Todd และในปี ค.ศ. 1961 โดย Lee และคณะ โดยพบว่าเมื่อใช้ derivative ของ 3'-Deoxyribose เป็นสารตั้งต้น และ 2, 5-di-O-benzoyl-3-deoxy-D-ribofuranosyl bromide เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ 3'-Deoxyadenosine จะได้ 3'-Deoxyadenosine-8-C¹⁴ และ 3'-deoxyneucleoside ชนิดอื่น ๆ นอกจาก cordycepin แล้วจากการทดลองใน *C. militaris* พบว่าประกอบด้วย beta-sitosterol, ergosterol, D-mannitol, adenine, adenosine การสกัดส่วนไม่ซีลีเนียมของ *C. militaris* ด้วยน้ำร้อน พบว่าประกอบด้วย 5'-adenosine monophosphate และกรดนิวคลีอิกอื่น ๆ อีกหลายตัว ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการถูกทำลายของเซลล์เม็ดเลือดของคน (Ikumoto *et al.*, 1991)

ในอุตสาหกรรมยามีความสนใจเกี่ยวกับการคัดเลือกหาสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากราเพื่อค้นหาชนิดใหม่ ราในกลุ่ม *C. sinensis* เป็นราที่ใช้เป็นยาจีนมาช้านาน ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของสารที่แยกจาก fruiting body ของรานชนิดนี้ พบว่าสารที่ได้มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ K562, Wish, Calu-1 และ Rajitumer cell line คุณสมบัติของสารแสดงให้เห็นว่า cordycepin สารตัวนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอก และ polysaccharides ที่แยกได้จากกระบวนการสกัดจาก *C. sinensis* มีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการเช่น ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ในหนู กระตุ้นการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง ยับยั้งการเจริญของเซลล์ human leukemic U 937 (Chen *et al.*, 1997) *C. militaris* สามารถผลิตสาร Cordycepin: 3'-Deoxyadenosine หรือเรียกว่า 9-cordyceposidoadenine มีสูตรโมเลกุล C₁₀H₁₃N₅O₃ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 251.24 ประกอบด้วย C 47.80% H 5.22% N

27.88% และ O 19.11% มีโครงสร้างเป็นผลึกรูปเข็ม จุดหลอมเหลว 225-226 °C มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 5 (Bentley W., 1951)

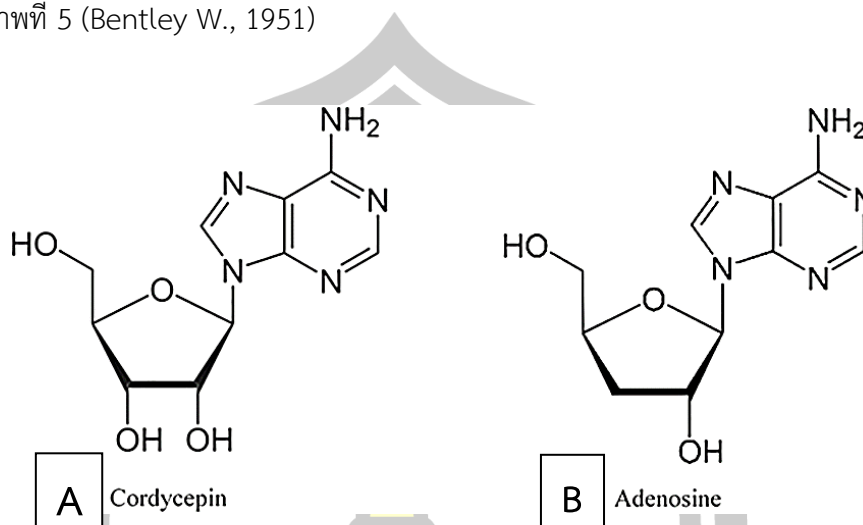


Figure 5 โครงสร้างทางเคมีของสารคอร์โดเซปิน (A) และสารอะดีโนซีน (B)

Table 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	
Pro-sexual	เสริมสมรรถนะทางเพศ
Anti-inflammatory	ต้านการอักเสบ
Anti-oxidant/anti-aging	ยับยั้งอนุมูลอิสระ/ชะลอความชรา
Anti-tumour/anti-acner/ anti-leukemic	ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว
Anti-proliferative	ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์
Anti-metastatic	ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง
Immunomodulatory	ระบบภูมิคุ้มกัน
Anti-microbial	มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ อันได้แก่ ไวรัส แบคทีเรียริคเกตเซีย เชื้อรา เชื้อปรสิต และโปรโตซัว
Insecticidal	มีฤทธิ์ฆ่าแมลง
Larvicidal	มีฤทธิ์ฆ่าหนอน
Anti-fibrotic	ต้านการเกิดเส้นใยพังผืด (Anti-fibrotic)
Steroidogenic	เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์
Hypoglycaemic	ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ

Hypolipidaemic	ลดไขมันในเส้นเลือด
Anti-angiogenic	ขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย
Anti-diabetic	ป้องกัน หรือบรรเทาอาการโรคเบาหวาน
Anti-HIV	ต้านเชื้อเอดส์
Anti-malarial	ต้านโรคมาลาเรีย หรือโรคไข้จับสั่น
Anti-fatigue	ลดอาการเหนื่อยล้า
Neuroprotective	ป้องกันเซลล์ประสาท
Liver-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ
Pneumo-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของปอด

ที่มา: Das และคณะ (2010)

Choi และคณะ (2011) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำของสาร cordycepin จากถั่งเช่าในการเหนี่ยวนำการตายและการกินตัวเองของเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ 2 ชนิด คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 ผลปรากฏว่าสาร cordycepin สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิดได้เป็นอย่างดี สมุนไพรที่มีส่วนผสมของถั่งเช่า มีอายุยืนยาวกว่า ไม่มีผลข้างเคียงและมีศักยภาพในการทนต่อการรักษาด้วยวิธีการแพทย์แผนปัจจุบันได้ดีกว่า

Chen และคณะ (2010) ได้ศึกษาศักยภาพของสาร cordycepin จากถั่งเช่าในการเหนี่ยวนำทำให้เซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ตาย (CGTH W-2) ซึ่งผลปรากฏว่าเซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ลดความสามารถในการมีชีวิตต่อไปและตายในที่สุดไม่กลายเป็นเนื้อร้าย

Lee และคณะ (2009) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ cordycepin ในการยับยั้งผลกระทบจากแสงแดดที่มีต่อผิว ทำให้ผิวเสีย (anti-skinphotoaging effects) ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีอยู่ในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ ได้แก่ metalloproteinase-1 (MMP-1) และ -3 ผลการทดลองพบว่า cordycepin สามารถป้องกัน (block) รังสี UVB ไม่ให้เหนี่ยวนำการสร้าง MMP จึงสามารถป้องกันการเสื่อมของผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีในแสงแดดได้

Li และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาผลของถั่งเช่าที่มีต่อการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ปลายประสาทและกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ผลปรากฏว่าถั่งเช่ามีผลต่อความสมดุลของหยิน-หยาง ซึ่งเหมาะที่จะเป็นยาและอาหารเสริมสุขภาพ

2.5 การกระตุ้นและสารกระตุ้นทางเคมีและชีวภาพ

2.5.1 Elicitation

Elicitation คือ การเติมสารซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิ พบว่าหลังจากพืชได้รับสารเหล่านี้ จะทำให้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมินั้นเพิ่มขึ้นจึงเป็นผลให้ปริมาณของสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น สารที่เติมลงไปเรียกว่าอิลิซิเตอร์ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ biotic elicitors เช่น จุลชีพหรือส่วนต่าง ๆ ของจุลชีพ และ abiotic elicitors เช่น สารเคมี หรือโลหะหนัก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวจะทำให้พืชเกิดสภาวะเครียด (Stress) ความเครียดเป็นปัจจัยสำคัญในเปลี่ยนแปลงปริมาณองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของพืช พืชที่ถูกกระตุ้นไม่ว่าจะจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม อาหารที่ไม่เพียงพอ อุณหภูมิ แลแสงศัตรูพืช สารเคมีและอื่น ๆ จะมีผลต่อการตอบสนองการผลิตสารพฤกษเคมีต่าง ๆ ออกมาเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ซึ่งสารที่พืชผลิตขึ้นมานั้นอาจเป็นสารเดิมที่มีอยู่แล้วหรืออาจเป็นสารใหม่ที่เกิดขึ้นจากการสภาวะเครียดนั้น ๆ ก็ได้ ส่วนมากพบว่าสารทุติยภูมิที่พืชผลิตออกมานั้นมักเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ ซึ่งอิลิซิเตอร์อาจกำหนดให้เป็นสารสำหรับปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดในพืช ซึ่งเมื่อนำไปใช้ในปริมาณน้อย ๆ จะก่อให้เกิดหรือปรับปรุงการสังเคราะห์สารประกอบเฉพาะในพืชนั้น ๆ ดังนั้นในด้านเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีการนำอิลิซิเตอร์มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถจัดจำแนกแบ่งย่อยอิลิซิเตอร์ได้ แสดงดังภาพที่ 6

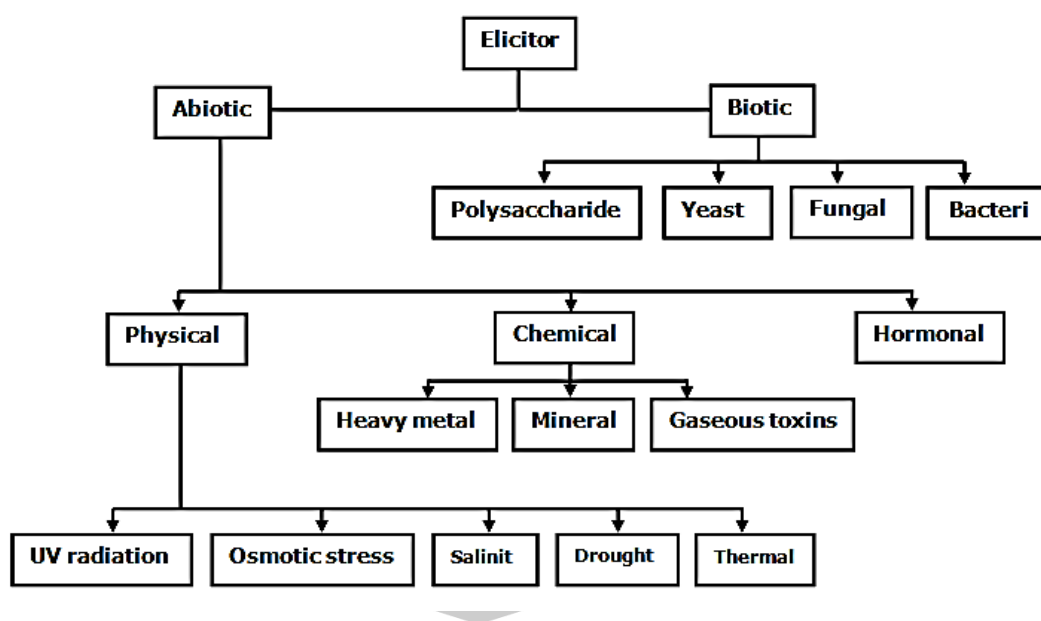


Figure 6 แสดงการจัดจำแนกชนิดของตัวกระตุ้น

ที่มา: Poornananda *et al.*,(2016)

ตัวกระตุ้นทางกายภาพเป็นหนึ่งในตัวกระตุ้นที่ได้รับการรายงานว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดสมุนไพรมะเขือเทศเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ซึ่งสามารถกระตุ้นและเสริมสร้างการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในเห็ดสมุนไพรมะเขือเทศ (Lu *et al.*, 2016) พบว่าเมื่อฉายรังสี (UV-C) มีผลทำให้ปริมาณวิตามิน D ทั้งในส่วนของหมวกเห็ดและก้านของเห็ดแชมปิยองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งปริมาณรังสี UV-C ที่ 2.0kJ/m² ให้ผลดีที่สุด จากรายงานของ (Ryoo *et al.*, 2018) พบว่าเห็ดหูหนูขาว (*Sparassis latifolia*) ที่ถูกฉายรังสี UV เป็นเวลานาน 10 นาที มีปริมาณ β -glucan เพิ่มขึ้น นอกจากนี้รายงานการใช้ตัวกระตุ้นที่เป็นแสงแล้ว การใช้ตัวกระตุ้นชนิดอื่นๆ เช่น (Sudheer *et al.*, 2016) ทำการศึกษาการให้โอโซนกับดอกเห็ดหลินจือที่ความเข้มข้น 5 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้เกิดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ โพลีแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นและกรดกาโนเดอริกก็เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าด้วย อย่างไรก็ตามการติดตามตรวจสอบระดับ H₂O₂ และ MDA เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดคำถามเกี่ยวกับคุณภาพของดอกเห็ดเนื่องจากระดับ MDA ที่สูงขึ้นอาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นจึงควรจะมีการศึกษาในระดับเซลล์เพื่อทำให้เข้าใจกลไกการเกิดความเครียดของเห็ดหลินจือและผลกระทบในมนุษย์ จึงแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นของโอโซนที่ 5 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากมีระดับ MDA ลดลง นอกจากนี้โอโซนจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วยังสามารถฆ่าเชื้อและลดการปนเปื้อนในระหว่างทำการเพาะปลูกเห็ดได้อีกด้วย



Table 2 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นทางกายภาพ ได้แก่ แสง ความเครียดออกซิเดทีฟ ความเค็ม และ อุณหภูมิ

ลำดับ	สารกระตุ้น	ชนิดเห็ด	สภาวะ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
1	UV	<i>Sparassis latifolia</i>	UV 254 nm , 10 min, 21°C, 95% Humidity	β - Glucan increase 45%	Ryoo <i>et al.</i> , 2018
2	Ozone	<i>Ganoderma lucidum</i>	ozone 5 μ L/L , 48 h.	Ganoderic acid ,phenolics , flavonoids, polysaccharides increase 2fold	Sudheer <i>et al.</i> , 2016
3	Temp.	<i>Sparassis latifolia</i>	Incubated temp. 21°C	β - Glucan increased 42%	Ryoo <i>et al.</i> , 2018
4	CaCl ₂	<i>Ganoderma lucidum</i>	CaCl ₂ conc. 25 mM	Ganoderic acid increased 1234.6 mg/l Control 779.6 mg/	Zhanga <i>et al.</i> , 2014
5	ZnCl ₂	<i>Ganoderma lucidum</i>	ZnCl ₂ conc. 25 mM	Ganoderic acid increased 1,219.5 mg/l control 779.6 mg/l	Zhanga <i>et al.</i> , 2014
6	Oligosaccharide	<i>Ganoderma lucidum</i>	Conc. 5g/l added to cultivation medium	Ganoderic acid increased 1,202.1 mg/l Control 779.6 mg/l	Zhanga <i>et al.</i> , 2014

ความเครียดจากแรงดันออสโมติก ความเค็ม ความเข้มข้นของน้ำตาล สามารถลดการเจริญเติบโตของพืชทางด้านสรีระแต่จะแปรเปลี่ยนกระบวนการทางสรีรวิทยาไปและเกิดกระบวนการเมตาโบลิซึมอื่นๆ การเกิดกลไก ดังกล่าวจะทำให้พืชสามารถปรับตัวให้เข้ากับความเครียดจากออสโมซิสออสโมติก และปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากความเข้มข้นของเกลือ น้ำตาล จนทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างผลิตภัณฑ์จากพืชอื่นๆ เช่น โพลีฟีนอล เทอร์ปีน และอัลคาลอยด์ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ (Naik and Al-Khayri 2016)

Zhang, Zhong, and Geng (2014) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือในอาหารเหลวโดยเติมตัวกระตุ้น คือ CaCl_2 และ ZnCl_2 ที่ความเข้มข้น 25 mM (v/v) พบว่า ปริมาณกรดกาโนเดอริกเพิ่มขึ้น 1.23 และ 1.22 g/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 0.78 g/L และยังได้ศึกษาการเติมน้ำตาลมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5 g/L ลงในอาหารเหลว พบว่าปริมาณกาโนเดอริกเพิ่มขึ้น 1.20 g/L ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 2.2) จากผลการทดลองเบื้องต้นไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวกระตุ้นแต่ละชนิดจึงสามารถเลือกตัวกระตุ้นชนิดใดชนิดหนึ่งได้ตามความต้องการของผู้เพาะเลี้ยง

2.5.2 ตัวกระตุ้นทางเคมี เช่น สารสกัดจากพืช เกลือแร่ ฮอโมน สารที่เป็นพืช

ตัวกระตุ้นทางเคมี เช่น สารสกัดจากพืช เกลือแร่ ฮอโมนหลายชนิดถูกนำมาทดลองเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นในการเพาะปลูกเห็ดสมุนไพรมัน และใช้กันอย่างแพร่หลายอย่างหนึ่ง คือ ฮอโมน ได้แก่ กรดจัสโมนิก (Jasmonic acid, JA) ซาลิไซลิก (Salicylic acid, SA) และกรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid, GA) เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการป้องกันสภาวะเครียดในพืช เป็นกลุ่มของสารประกอบ cyclopentanone ทำหน้าที่ในการส่งเสริมการผลิตสารเมตาบอไลต์ในอาหารเพาะปลูกพืช โดยการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุพันธ์ ที่นิยมนำมาใช้มักเป็นเมธิลจัสโมเนต (MeJA) เพราะสามารถทำให้เกิดการผลิตและสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ได้หลายประเภท เช่น rosmarinic, alkaloid, terpenoid เป็นต้น นอกจากฮอโมนแล้วสารสกัดจากพืชหลายชนิดก็ยังคงนำมาใช้ในการเป็นตัวกระตุ้นในการเพาะปลูกเห็ดสมุนไพรมันเพื่อให้เกิดการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการอีกด้วย

Zhang, Zhong, and Geng (2014) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือในอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดกาโนเดอริกโดยใช้ตัวกระตุ้นเป็นเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ที่ความเข้มข้น 5 mg/L เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าปริมาณกรดกาโนเดอริกเพิ่มขึ้นสูงที่สุด 1.33 g/L ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ 0.78 g/L (ตารางที่ 2.3)

Xu, Zhang, and Chen (2016) ศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มการผลิตไตรเทอร์พีนอยด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดหิ้งไซปรีเรีย (*Inonotus obliquus*) โดยใช้ MeJA เป็นตัวกระตุ้นที่ความ

เข้มข้น 50 พบว่าได้ปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 99.72 mg/g น้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้น 65.8% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่การใช้กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic) เป็นตัวกระตุ้นที่ความเข้มข้น 1.5 g/L ให้ผลการผลิตไตรเทอร์พีนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 64.93 mg/g น้ำหนักแห้ง เป็น 94.61 mg/g น้ำหนักแห้ง

Ma *et al.* (2017) ได้ทดลองใช้สารสกัดจากพืช 11 ชนิด เป็นตัวกระตุ้นเพื่อเพิ่มการผลิตสารไตรเทอร์พีนอยด์และเอกโซโพลีแซ็ก คาร์ไบด์ของเห็ดคนมเสื่อ (*Lignosus rhinocerus*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าสารสกัดจาก *Radix polygoni* และ Chamomile เมื่อเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 15 และ 5 g/L มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการผลิตเอกโซโพลีแซคคาไรด์ และไตรเทอร์พีนอยด์มีปริมาณเท่ากับ 4.15 g/l และ 6.8 mg/g ตัวอย่าง ตามลำดับ

Ye *et al.* (2018) ศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์และไตรเทอร์พีนอยด์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ไม่มีผลต่อการสร้างโพลีแซคคาไรด์และไตรเทอร์พีนอยด์ ขณะที่กรดซาลิไซลิกมีผลต่อการสร้างไตรเทอร์พีนอยด์เพิ่มขึ้น 23.32% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่มีอิทธิพลต่อการผลิตโพลีแซคคาไรด์น้อยกว่าที่น่าสนใจคือเมื่อใช้ตัวกระตุ้นร่วมกันระหว่างแคลเซียมไอออนกับกรดซาลิไซลิก พบว่าปริมาณโพลีแซคคาไรด์และไตรเทอร์พีนอยด์เพิ่มขึ้น 9.02% และ 13.61% ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม



Table 3 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นทางเคมี เช่น สารสกัดจากพืช เกือบแร่ ฮอร์โมน สารที่เป็นพิษ

ลำดับ	สารกระตุ้น	ชนิดเห็ด	สภาวะ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
1	Cellulase	<i>Ganoderma lucidum</i>	Cellulase Conc. 5 mg/l 3 day	Ganoderic acid increased 1334.5 mg/l control (779.6 mg/l)	Zhanga <i>et al.</i> , 2014
2	SA	<i>Ganoderma lucidum</i>	SA (10 mg/ mL in ethanol) 20 ml every 3 days (30 mg/mL in distilled water+ SA (10 mg/ mL in ethanol) Ca 216 ml. + : SA 20 ml every 3 days another 30 days	triterpenoid increased 2.15 mg/g control 12.18 mg/g	Ye <i>et al.</i> , 2018
3	Ca ²⁺ +SA	<i>Ganoderma lucidum</i>		polysaccharides increased 13.53 mg/g control 12.35 mg/g	Ye <i>et al.</i> , 2018
4	Jasmonic acid	<i>Inonotus obliquus</i>	Conc. (JA) 50 µg/l 48 h after inoculation , shaker another 12 days	total phenolic compounds increased 70.56 mg/g sample	Zheng, 2009
5	Methyl jasmonate	<i>Inonotus obliquus</i>	Conc. (JA) 50 µg/l added in 2 mL/L of the culture medium	Day 6 ,Total triterpenoid increased 99.2 mg/g Control 64.93 mg/g	Xu, 2016

Table 4 การศึกษาการใช้ตัวกระตุ้นจากสิ่งมีชีวิต (Biotic elicitor) เช่น ยีสต์ ฟังไจ แบคทีเรีย

ลำดับ	สารกระตุ้น	ชนิดเห็ด	สภาวะ	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	อ้างอิง
1	<i>Alternaria alternata</i> plant-pathogenic ascomycete	<i>Inonotus obliquus</i>	alternate conc.40 mg/l	total phenolic compounds increased 70.56 mg/g sample	Weifa Zheng, 2009
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Antrodia cinnamomea</i>	25% <i>S. cerevisiae</i> added to cultivation medium	triterpenoids content increased 62.2 mg/g DW	Chin-Hang Shu, 2015
3	Tuber sinense polysaccharide and protein extracted	<i>Ganoderma lucidum</i>	Polysaccharide conc. 60 mg/L on day 8		Li-Wen Zhu, 2008

2.5.2 ตัวกระตุ้นจากสิ่งมีชีวิต (Biotic elicitor) เช่น ยีสต์ ฟังไจ แบคทีเรีย

Xu *et al.*, (2016) ศึกษาการกระตุ้นการสังเคราะห์ไตรเทอร์พีนอยด์ของเห็ดแอนโทเรเดีย ในอาหารเหลว โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักแบบสอง ขั้นตอน พบว่า ในขั้นตอนที่สองสถานะที่มีออกซิเจนจำกัด พบว่ามีปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์เท่ากับ 38.0 mg/g น้ำหนักแห้ง (ชุดควบคุม) มีปริมาณไตรเทอร์พีนอยด์เพิ่มขึ้นเป็น 46.5 mg/g น้ำหนักแห้ง เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* คิดเป็น 25% และเมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ได้ไตรเทอร์พีนอยด์เท่ากับ 62.2 mg/g น้ำหนักแห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม 110% และ 64% ที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4)

Zheng *et al.*, (2009) ศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพของการเพาะเลี้ยงเห็ดหิ้งไซปรีเรีย (*Inonotus obliquus*) โดยใช้เชื้อราก่อโรคในพืชชนิด *Alternaria alternata* เป็นตัวกระตุ้น เชื้อราดังกล่าวจะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองหลายๆ อย่างในเซลล์ ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของไนตริกออกไซด์ (NO) กิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และการสะสมของสารประกอบฟีนอลในเซลล์ พบว่าการใช้เชื้อรา *Alternaria alternata* ที่ในความเข้มข้น 40 mg/L ในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลทำให้ระดับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเส้นใยเห็ดเพิ่มขึ้นเป็น 70.56 mg/g ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.4)

2.6 ปัจจัยในการใช้ตัวกระตุ้น

ตัวกระตุ้นถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเพิ่มการผลิตหรือทำให้เกิดการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในเห็ดสมุนไพร แต่ก็มีปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิที่ควรพิจารณาดังนี้

ความเข้มข้นของตัวกระตุ้น ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นที่นำมาใช้มีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการกระตุ้นให้เกิดการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากสารที่นำมาใช้เป็นตัวกระตุ้น หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปแทนที่ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองในการเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการ แต่จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ดังนั้นจึงควรศึกษาปริมาณที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้

ระยะเวลาของการใช้ตัวกระตุ้น จากรายงานของ (Xu *et al.*, 2016) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือโดยใช้ MeJA และ SA เป็นตัวกระตุ้นที่ระยะเวลาตั้งแต่ 24-72 ชั่วโมง พบว่า MeJA (15 mM) สามารถกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดหลินจือผลิตกรด ganoderic สูงสุดที่ 72 ชั่วโมง (135.41 ± 0.43 mg/g น้ำหนักเซลล์แห้ง แต่หากรยะเวลามากกว่า 72 ชั่วโมงจะทำให้การผลิตลดลง

ธาตุอาหาร นอกจากตัวกระตุ้นที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว องค์ประกอบของธาตุอาหารหลักที่พืชควรได้รับยังมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมกระบวนการทำงาน

ของตัวกระตุ้นให้เกิดการกระตุ้นหรือชักนำให้เกิดการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการได้ดียิ่งขึ้นด้วย

2.7 การจัดการทดลอง Plackett and Burman design

Plackett and Burman (1946) ได้เสนอการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Plackett-Burman โดยประยุกต์ออกแบบการทดลองด้วยวิธีแฟคทอเรียล 2 ระดับในการวิเคราะห์หาปัจจัยที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อค่าตอบสนองที่ต้องการจากปัจจัยจำนวนมากและมีประโยชน์ในการคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญเพื่อนำไปศึกษาต่อไป ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัยจะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลองที่มีเป็นจำนวนมากตัวอย่างเช่นถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ 2^n พบว่าถ้ามีปัจจัย 7 ปัจจัยจะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลองทำให้ในการทดลองใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูงจึงเป็นการยากที่จะทำการทดลองทั้ง 128 สิ่งทดลองดังนั้นแผนการทดลอง Plackett and Burman design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษากล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น (Wu *et al.*, 2000)

การจัดการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลหรืออาจจัดให้เป็นแฟคทอเรียลบางส่วนที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตรหรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 10-20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1-4 ปัจจัยโดยไม่ต้องทำการทดลองจำนวนมากสามารถลดจำนวนการทดลองได้โดยใช้เทคนิคนี้แต่การทดลองนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาขอบเขตหรือชนิดของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวแปรได้ (Motola *et al.*, 1992) วิธีนี้เหมาะที่จะใช้ในการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยที่ไม่มีความสำคัญทางสถิติออกการจัดการทดลองจะใช้ 2^k factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยมีแบบแผนมาตรฐานดัง (แสดงในตารางที่ 5)

พหุ ประถม ศึกษา

Table 5 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก $N-1$ ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง, $K=N-1$																						
8	+	+	+	-	+	-	-																
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-												
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-							
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

หมายเหตุ + หมายถึงระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับสูงซึ่งมีค่าเท่ากับ + 1

- หมายถึงระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับต่ำซึ่งมีค่าเท่ากับ - 1

N หมายถึงจำนวนสิ่งทดลอง (treatment)

K หมายถึงจำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ในการใช้ Plackett and Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดังเมตริกแถวแรกจากนั้นสิ่งทดลองต่อไปกำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) กล่าวคือนำรหัสสุดท้ายของ initial block ขึ้นมาลำดับหน้าสุดและวนไปจนครบ $N-1$ รอบส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น added block คือใช้ระดับต่ำสุดทุกปัจจัยอย่างไรก็ตามในการวนอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้ายและวนไปจนครบ $N-1$ รอบได้เช่นกันเพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญดังแสดงในตารางที่ 6

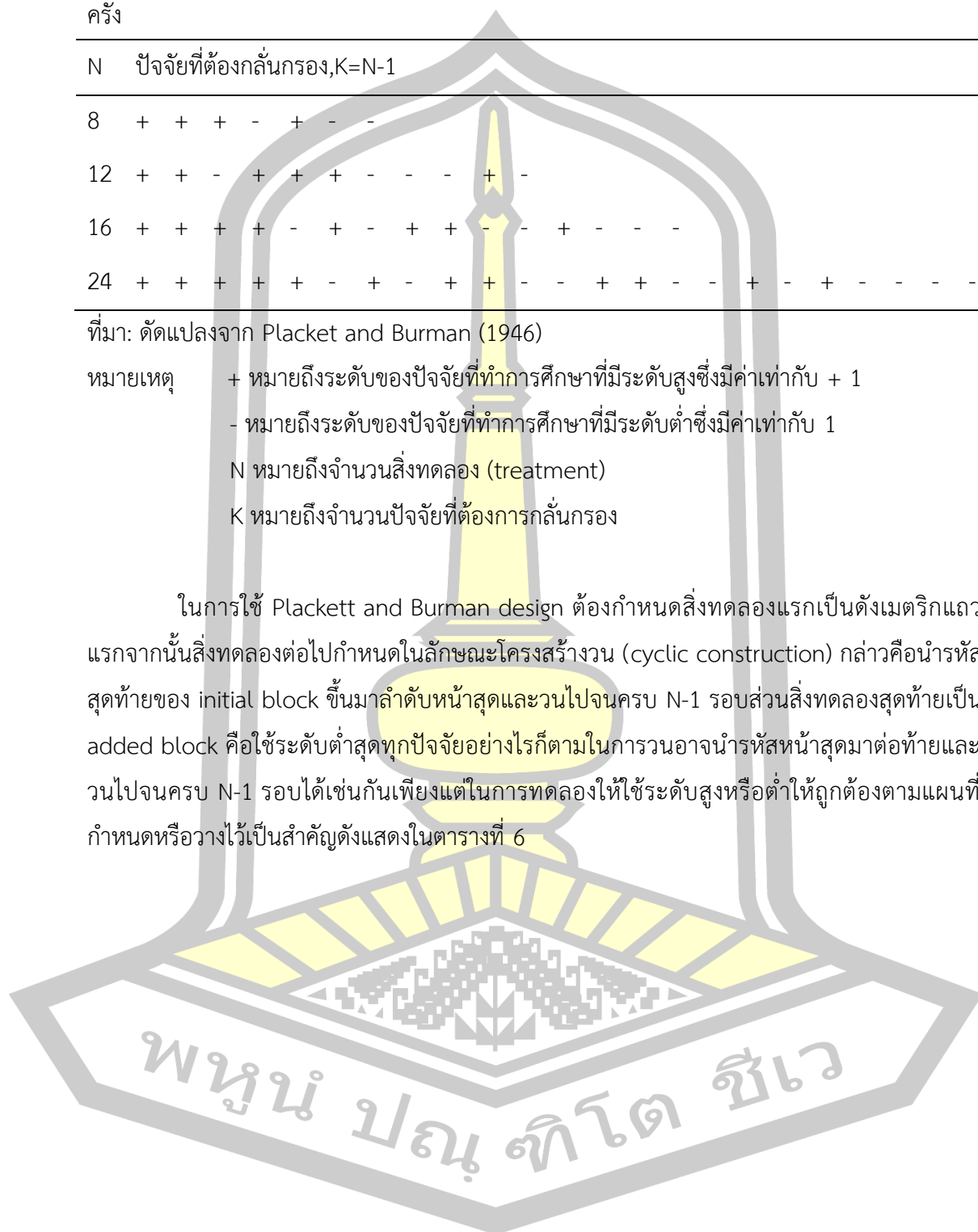


Table 6 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัยโดยมีสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 8 การทดลอง

สิ่งทดลอง (Treatment)	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง (Factor)						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	+	-	+	-	-
2	-	-	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	+	-	+	+	+
6	+	-	-	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

ที่มา : คัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

2.8 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

Response Surface Methodology (RSM) เป็นการรวบรวมข้อมูลทางสถิติและเทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและหาสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้เพื่อหาคุณลักษณะของคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าตัวแปรตอบสนองหรือผลลัพธ์โดยในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของผลลัพธ์กับปัจจัยการทดลองจะต้องมีการวางแผนและออกแบบการทดลองให้เหมาะสมกับลักษณะของข้อมูลด้วย (Box *et al.*, 1978)

การออกแบบการทดลองเพื่อการปรับปรุงคุณภาพ (design of experiment: DOE) แต่ละกระบวนการผลิตนั้นจะมีจำนวนปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพต้นทุนและคุณภาพของกระบวนการผลิตแต่ปัญหาก็คือจะสามารถหาจุดที่เหมาะสมของปัจจัยเหล่านั้นได้อย่างไรดังนั้นการออกแบบการทดลองเป็นวิธีที่จะช่วยให้เราสามารถทำการทดลองและเก็บข้อมูลอย่างเป็นระบบแล้วนำข้อมูลเหล่านั้นไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติซึ่งจะทำให้ได้ผลลัพธ์ที่เชื่อถือได้ว่าควรจะต้องปรับตั้งปัจจัยต่าง ๆ อย่างไรเพื่อให้ได้กระบวนการทำงานมีประสิทธิภาพต้นทุนการผลิตต่ำและได้สินค้าคุณภาพดีนอกจากนี้การออกแบบการทดลองจะใช้เวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลองที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการลองผิดลองถูก

การออกแบบการทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองที่อาศัยค่ากลางของข้อมูลจากระดับปัจจัยที่ส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุดโดยนิยมออกแบบการทดลอง 2 วิธีคือการทดลองแบบ Box-Behincken Design (BBD) และ Central Composite Design (CCD) โดยใช้การกระจายระดับของข้อมูลออกจากศูนย์กลางเพื่อศึกษาระดับของปัจจัยส่งผลต่อตัวแปรตอบสนองสูงสุดลักษณะการวางตำแหน่งและการกระจายระดับของปัจจัยแสดงดังภาพที่ 2.7 เห็นได้ว่าการออกแบบการทดลองแบบ BBD นั้นจะเน้นที่จุดรอบ ๆ ค่ากลาง (center point) โดยไม่รวมค่าการกระจายในระดับแกน (star point) และค่าที่มุม (factorial point) ทำให้ค่าคงที่ได้ไม่ครอบคลุมปลายสุดของระดับปัจจัยดังนั้นการออกแบบการทดลองจึงได้รับความนิยมมากกว่า (Draper *et al.*, 2006)

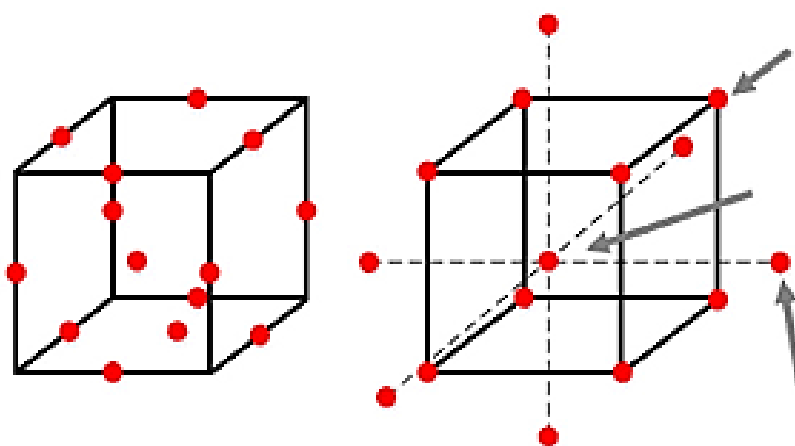


Figure 7 โมเดลแสดงการกระจายของปัจจัย

ที่มา : Anonymous (2008)

การทำพื้นผิวตอบสนองนั้นมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) กับกลุ่มของ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตอบสนองนั้น ๆ วิธีการดังกล่าวนี้ใช้การวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) มาประยุกต์ในการหารูปแบบความสัมพันธ์ที่เรียกว่ารูปแบบพหุนาม (Polynomial model) โดยทั่วไปรูปแบบของพื้นผิวตอบสนองจะพิจารณารูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 (first order model) หรือลำดับที่ 2 (second order model) ส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์ หรือสัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบดังกล่าวจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (นวรรตน์ จันทรกระเวน 2548; อนุวัตร แจ่มชัด 2549)

รูปแบบพหุนามลำดับที่ 1 โดยทั่วไปมีการนำมาเฉพาะบางแผนการทดลองซึ่ง Khuri and Cornell (1987) ได้กล่าวไว้คือการออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 2 ระดับ (2 tictorial)

รูปแบบพอลิโนเมียลลำดับที่ 2 มีแผนการทดลองเช่น Central Composite Design, การออกแบบเชิงแฟคทอเรียล 3 ระดับ (3 factorial) เป็นต้นคือจะต้องมีระดับการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับ Khun and Cornell (1987) ซึ่งรูปแบบพอลิโนเมียลลำดับที่ 2 สำหรับ k ตัวแปรมีรูปแบบดังสมการที่ 1

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + E \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

โดยที่ Y คือตัวแปรตอบสนอง

β คือสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอย

X_i, X_j คือตัวแปรอิสระ

E คือความคลาดเคลื่อน

2.9 แผนการทดลอง Central Composite Design (CCD)

Central Composite Design (CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไป CCD จะประกอบด้วย 2 แฟกทอเรียลที่มี 2^n รันซึ่ง 2 รันในแนวแกนหรือแนวรูปดาวและ $2n$ รันที่จุดศูนย์กลางแสดง CCD สำหรับ $k = 2$ และ $k = 3$ ปัจจัยแสดง (ภาพที่ 8)

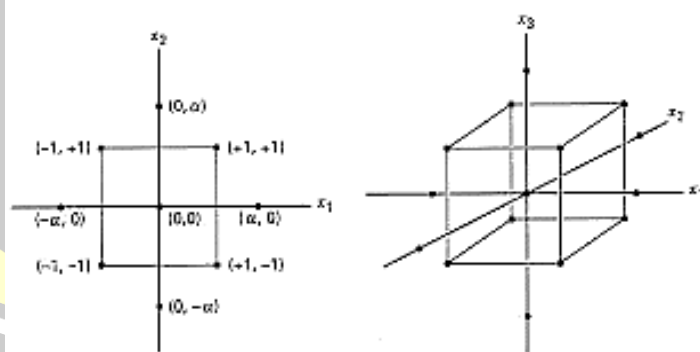


Figure 8 Central Composite Design (CCD) a สำหรับ $k = 2$ ปัจจัย 6 สำหรับ $k = 3$ ปัจจัย

CCD เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับปัจจัยแต่เป็นการลดสิ่งทดลองขณะที่ CCD 3 ปัจจัยจะมีการทดลองทั้งหมด $2^3 + (2 \times 3 + 1)$ โดยที่เทอม $(2n + 1)$ เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมาและเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลางเป็น 3 จะได้เท่ากับ 17 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์ วิริยจारी 2544) ดังแสดงใน (ตารางที่ 7)

Table 7 ค่าของ crowde level ใน Central Composite Design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

Treatment	Code lever		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1.68	0	0
10	0	-1.68	0
11	0	0	-1.68
12	+1.68	0	0
13	0	0	0
14	0	0	+1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

ที่มา: อนุวัตร แจ่มชัด (2549)

2.10 การวิเคราะห์การถดถอย

การถดถอยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปในการวิเคราะห์การถดถอยจะเรียกตัวแปรที่สนใจว่าตัวแปรตาม (dependent variable) ส่วนตัวแปรที่แทนปัจจัยต่าง ๆ เรียกตัวแปรอิสระ (independent variable) โดยเริ่มพิจารณาว่าตัวแปรตามและตัวแปรอิสระมีความสัมพันธ์กันในลักษณะใดสร้างรูปแบบการถดถอยเพื่อแทนลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างตัว

แปรและสร้างสมการการถดถอย (regression equation) จากรูปแบบที่กำหนดนั้นโดยวิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method) นอกจากนี้สมการการถดถอยที่สร้างขึ้นจะเป็นสมการที่เหมาะสมหรือไม่นั้นจะพิจารณาได้จากค่าสถิติและการทดสอบสมมติฐานค่าสถิติที่ใช้เช่นค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแล้ว (adjusted coefficient of determination: R) ส่วนการทดสอบสมมติฐานเป็นการพิจารณาว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัวมีอิทธิพลหรือมีส่วนในการอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามหรือไม่ (นวรรัตน์ จันทร์กระเวน 2548)

ในการวิเคราะห์การถดถอยเพียงตัวแปรเราเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่าการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) ส่วนกรณีที่มีตัวแปรอิสระมากกว่า 1 ตัวแปรจะเรียกการวิเคราะห์การถดถอยนี้ว่าการวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple regression analysis)

ข้อกำหนดในการวิเคราะห์การถดถอย

- ก. ข้อมูลตัวแปรตามมีการแจกแจงแบบปกติ
- ข. ค่าเฉลี่ยของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากับศูนย์
- ค. ความแปรปรวนของค่าคลาดเคลื่อนมีค่าคงที่
- ง. ค่าคลาดเคลื่อนแต่ละตัวเป็นอิสระต่อกัน

2.10.1 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย

เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ 1 ตัวและตัวแปรตามรูปแบบสมการการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่ายแสดงดังสมการที่ 2 (วิรัชช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + E \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 2}$$

2.10.2 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลที่มีตัวแปรอิสระตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปซึ่งเขียนสมการการถดถอยเชิงพหุคูณเมื่อมีตัวแปรอิสระตัวแสดงดังสมการที่ 3 (วิรัชช, 2546)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + E \quad \dots\dots\dots \text{สมการที่ 3}$$

2.10.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการถดถอยเชิงพหุคูณ

เป็นการทดสอบว่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ($\beta_1, \beta_2, \beta_k$) มีค่าเท่ากับ 0 หรือไม่ซึ่งถ้าพบว่ามีอย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนอง (Y) และตัวแปรอิสระ (X_1, X_2, \dots, X_3)

สมมติฐานที่ใช้ทดสอบคือ

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$$

(ตัวแปรหรือปัจจัยที่ศึกษาไม่มีอิทธิพล)

$$H_0 : \beta_1 \text{ อย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0}$$

(มีตัวแปรหรือปัจจัยอย่างน้อย 1 ตัวที่มีอิทธิพลต่อการศึกษา)

ถ้ายอมรับ H_0 หมายความว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

ถ้าปฏิเสธ H_0 หมายความว่ามีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามแสดงว่าสมการการถดถอยที่สร้างสามารถอธิบายการผันแปรของตัวแปรอิสระได้

2.11 การตรวจสอบความเหมาะสมของสมการการถดถอย

2.11.1 normal probability plot ของค่าคลาดเคลื่อน

เป็นวิธีการสร้างกราฟที่พล็อตค่าของข้อมูลจริงที่เกิดขึ้นกับค่าที่คาดไว้ (expected value) ถ้าข้อมูลตัวอย่างสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติแล้วค่าที่คาดไว้จะเป็นเส้นตรงและค่าจริงจะอยู่รอบ ๆ เส้นตรงนั้นโดยค่าที่อยู่เหนือเส้นตรงแสดงว่าค่าจริงมากกว่าค่าที่คาดไว้ส่วนค่าที่อยู่ใต้เส้นตรงคือค่าจริงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้จึงใช้ในการตรวจสอบความคลาดเคลื่อนมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่

2.11.2 การทดสอบความคงที่ของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน

เป็นการตรวจสอบความเป็นอิสระหรือความคงที่ของความคลาดเคลื่อนโดยใช้กราฟการกระจาย (Scatterplot) ระหว่างค่า regression standardized residual บนแกน Y กับค่า regression predicted value บนแกน X พบว่าจุดมีการกระจายอย่างไม่มีรูปแบบและกระจายรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์แสดงว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนค่อนข้างคงที่

2.11.3 การทดสอบค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

เป็นการตรวจสอบความเหมาะสมของค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกันโดยใช้กราฟระหว่างค่า regression standardized residual บนแกนกับค่า run number บนแกน X พบว่ากราฟมีการกระจายตัวแบบสุ่มรอบเส้นกึ่งกลางศูนย์และไม่มีลักษณะของแนวโน้มหรือมีรูปแบบอย่างชัดเจนแสดงว่าค่าความคลาดเคลื่อนเป็นตัวแปรสุ่มและมีความเป็นอิสระต่อกัน

2.11.4 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R)

เป็นส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ที่ตัวแปรทำนายสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$R^2 = \text{ความผันแปรของ } Y \text{ เนื่องจากอิทธิพลของ } X_1, X_2, \dots, X_k / \text{ความผันแปรทั้งหมด}$$

Hu (1999) รายงานว่าสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใด ๆ ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตามแต่ที่ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์) เนื่องจากข้อเสียของสัมประสิทธิ์การตัดสินใจคือเมื่อตัวแปรอิสระเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่า R^2 เพิ่มขึ้นตามไปด้วยอีกทั้งในกรณีที่จำนวนข้อมูลในตัวอย่างไม่น้อยการพิจารณาค่า R^2 อาจคลาดเคลื่อนเพราะค่า R^2 มีค่าสูงเกินความเป็นจริงการแก้ไขทำได้โดยใช้ค่า adjust R^2 แทนซึ่งถ้า adjust R^2 มีค่ามากกว่า 64 เปอร์เซ็นต์ (> 0.64) แสดงว่ารูปแบบสมการเหมาะสม

2.11.5 การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมโดยการหาค่าเบี่ยงเบนของข้อมูล

การตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมซึ่งเป็นการเปรียบเทียบของข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับข้อมูลที่ได้จากการทำนายโดยการหาค่าเบี่ยงเบนระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและข้อมูลที่ได้จากการทำนายเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

$$\text{ค่าเบี่ยงเบน Error (\%)} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการทดลอง} - \text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}}{\text{ค่าที่ได้จากการทำนาย}} \times 100$$

2.11.6 เลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุด

ในการวิจัยเชิงปริมาณตัวแปรอิสระที่นำมาศึกษาจะมีหลายตัวแปรสมการการถดถอยที่เหมาะสมควรเป็นสมการที่มีตัวแปรอิสระน้อยที่สุดและอธิบายความผันแปรของตัวแปรตามได้ดีที่สุด ดังนั้นเมื่อมีตัวแปรอิสระหลายตัวจึงควรเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญการเลือกตัวแปรอิสระที่สำคัญจะทำได้ด้วยวิธีการเลือกสมการการถดถอยแบบต่าง ๆ ซึ่งวิธีการเลือกสมการการถดถอยที่ดีที่สุดที่ใช้กันมากได้แก่วิธีพิจารณาทุกสมการ (all possible regression) วิธีลดตัวแปรอิสระ (backward elimination procedure) วิธีเพิ่มตัวแปรอิสระ (forward selection procedure) และวิธีเพิ่มตัวแปรอิสระแบบขั้นตอน (stepwise procedure) (นวรรตน์ จันทร์กระเวณ 2548)



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- ตู้บ่มเพาะเชื้อ
- หม้อนึ่งความดันไอ
- ตู้เขย่าเชื้อ
- เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator)
- เครื่องวัด pH meter
- บีกเกอร์
- จานเพาะเชื้อ
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เครื่องเขย่าสารแบบวงกลมในแนวนอน (Flask Orbital Shaker)
- เครื่อง HPLC
- เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer
- Vortex mixer
- เครื่องซั่งละเอียด
- เครื่องอบลมร้อน (hot air oven)
- หม้อนึ่งความดัน
- ขวดแก้วขนาด 16 ออนซ์ เจาะฝาสำหรับเพาะเห็ดถึงเช่า
- Hot air oven
- เครื่องอ่านไมโครเพลต

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Potato Dextrose Broth (PDB)
- สารกลุ่มนิวคลีโอไซด์ ได้แก่ cordycepin และ adenosine
- สารการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ FRAP

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

แผนผังการวิจัย

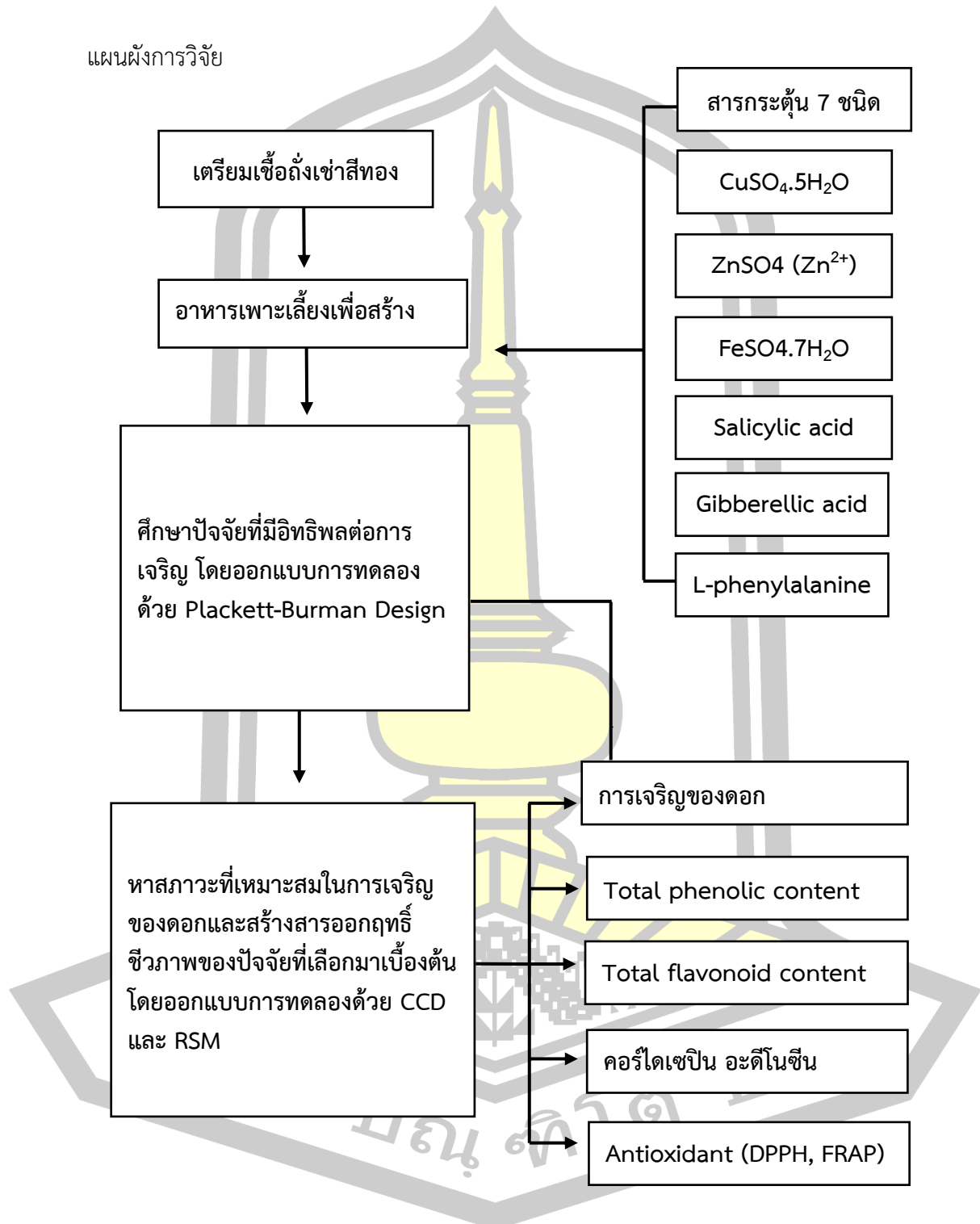


Figure 9 แผนผังการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง

3.3 การหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design

Table 8 ปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาโดยใช้ Plackett-Burman design

สัญลักษณ์	ตัวแปร	ค่าที่ใช้ในการทดลอง		เอกสารอ้างอิง
		ค่าต่ำ (1-)	ค่าสูง (1+)	
X ₁	CaCl ₂ (Ca ²⁺) (g/L)	0.01	0.5	Suparmin <i>et al.</i> , 2017
X ₂	CuSO ₄ .5H ₂ O (Cu ²⁺) (mg/L)	0.67	3.35	Suparmin <i>et al.</i> , 2017
X ₃	ZnSO ₄ (Zn ²⁺) (mg/L)	0.1	0.5	Suparmin <i>et al.</i> , 2017
X ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O (Fe ²⁺) (mg/L)	0.1	2	Suparmin <i>et al.</i> , 2017
X ₅	salicylic acid (mg/L)	6	20	Mahalakshmi <i>et al.</i> , 2013
X ₆	gibberellic acid (mg/L)	0.5	3	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2005
X ₇	L-phenylalanine (mg/L)	0.5	2.5	Govindaraju and Indra Arulselvi, 2018

พหุ ประถมศึกษา

Table 9 การจัดการทดลอง Plackett-Burman design ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของถั่วงอกในอาหารแข็งสร้างดอกเห็ด

รัน	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	0.50	3.35	0.10	0.10	6.00	3.00	0.50
2	0.50	3.35	0.50	0.10	6.00	0.50	2.50
3	0.50	0.67	0.50	2.00	20.00	0.50	0.50
4	0.01	3.35	0.10	2.00	20.00	0.50	2.50
5	0.01	0.67	0.10	0.10	6.00	0.50	0.50
6	0.01	0.67	0.50	0.10	20.00	3.00	0.50
7	0.01	0.67	0.10	2.00	6.00	3.00	2.50
8	0.50	0.67	0.10	0.10	20.00	0.50	2.50
9	0.50	0.67	0.50	2.00	6.00	3.00	2.50
10	0.01	3.35	0.50	2.00	6.00	0.50	0.50
11	0.01	3.35	0.50	0.10	20.00	3.00	2.50
12	0.50	3.35	0.10	2.00	20.00	3.00	0.50

3.4 การเตรียมหัวเชื้อและการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่วงอก

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำ Fruiting body ของเห็ดถั่วงอก (*Cordyceps militaris*) ซึ่งซื้อจากฟาร์มลุงหยุด แชมป์ประเสริฐ จ.สระบุรี มาเลี้ยงในอาหารแข็งที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (PDA) เป็นเวลา 7 วัน บ่มในที่มืดในตู้บ่มที่ 18 องศาเซลเซียส ก่อนตัดเส้นใยลงเลี้ยงในอาหารเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (PDB) เป็นเวลา 14-21 วัน บ่มในที่มืด ในตู้บ่มที่ 18 องศาเซลเซียส เขย่าขวดวันละสองครั้งเข้าเย็น เชื้ออาหารเหลวจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2 การเพาะเลี้ยงบนอาหารเพื่อสร้างดอกเห็ด

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังแสดงใน (ตารางที่ 9) ซึ่งในการเตรียมอาหารเหลวเพื่อเติมลงไปในช่วงที่มีข้าวเจ้าอยู่จะเตรียมองค์ประกอบต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.2 มีทั้งหมด 7 ปัจจัย ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}) g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) (mg/L), ZnSO_4 (Zn^{2+}) (mg/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}) (mg/L), salicylic acid (mg/L), Gibberellic acid (mg/L), L-phenylalanine (mg/L) ให้สัญลักษณ์ X₁-X₇ ซึ่งช่วงความเข้มข้นที่ใช้ได้จากการศึกษาจากงานวิจัย

อื่น ๆ หลังออกแบบการทดลองจาก 7 ปัจจัย ด้วย Plackett-Burman design เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุด ต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์สำคัญ สามารถออกแบบการทดลองได้ทั้งหมด 12 การทดลอง ดังตารางที่ 9 โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเพาะดังนี้

3.4.2.1 ล้างมันฝรั่งและข้าวโพดฟักอ่อนให้สะอาด ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นตามขวางประมาณ 200 กรัม ต้มในน้ำกลั่น 1200 มิลลิลิตร เตือดนาน 15 นาที แล้วกรองเอาน้ำ

3.4.2.2 ชั่งสารทั้งหมด (ตารางที่ 8 และ 9) แล้วนำมาละลายในน้ำมันฝรั่งสกัด ปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.0

3.4.2.3 ปั่นผักแต่ใหม่และไข่ไก่ต้มโดยเครื่องปั่น ในปริมาณตามที่ระบุใน ตารางที่ 10 ผสมลงในส่วนผสมเบื้องต้น

3.4.2.4 ชั่งข้าวเจ้าลงในขวดเพาะขนาด 16 ออนซ์ ที่เจาะฝาและมีสำลีปิดที่รู ขวดละ 35 กรัม จากนั้นเติมอาหารที่ได้จากการเตรียมในเบื้องต้น 40 มิลลิลิตร ต่อขวด

3.4.2.5 นำขวดอาหารไปนึ่งข้าวให้สุกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำออกมาพักทิ้งไว้ 1 คืน

3.4.2.6 เขย่าขวดหัวเชื้อเหลวก่อนนำมาใช้ หยอดเชื้อถึงเช่าสี่ทองลงไปขวดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยไซริงปลอดเชื้อ ลงในอาหารบริเวณตรงกลางของขวดอาหาร

3.4.2.7 ทำการบ่มเลี้ยง ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะการเจริญของเส้นใย บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ความชื้น 60-65% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระยะกระตุ้นให้ออกดอก โดยเปิดไฟให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ความชื้น 60-65% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ระยะการเจริญเติบโตของดอก เมื่อถึงเช่าสี่ทองมีดอกยาวขนาด 1 เซนติเมตร ปรับให้แสงลดลงเหลือ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส เพิ่มความชื้น 70-75% เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

3.4.2.8 ฟันสเปรย์ 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในห้องเพาะเลี้ยงทุกวัน วันละ 1 ครั้ง กรณีเส้นใยเกิดเป็นจำนวนมากแต่ไม่เกิดตุ่มดอก (บ้ำใย) ให้เตรียมสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาสเปรย์มาพ่นลงในขวดอาหาร (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ)

3.4.3 การเก็บเกี่ยวดอกเห็ด

นำสเปรย์แอลกอฮอล์มาพ่นฆ่าเชื้อบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยวเห็ดถึงเช่าสี่ทอง และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องแล้วเช็ดให้แห้ง ใช้มีดที่ทำความสะอาดแล้วตัดแบ่งเห็ดออกเป็น 4 ส่วน แล้วใช้ปากคีบที่เช็ดทำความสะอาดแล้วค่อยๆ ดึงก้านเห็ดถึงเช่าสี่ทองออกมาจากขวด วางเรียงในถาด แยกวัสดุเพาะที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวโดยใช้มีด นำมาวางลงในถาดที่ทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ก่อนนำไปอบดอกเห็ดและวัสดุเพาะเห็ดถึงเช่าสี่ทองที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยก้านเห็ดถึงเช่าสี่ทองใช้เวลาในการอบ 24 ชั่วโมง และวัสดุเพาะเห็ดถึงเช่าสี่ทองใช้ระยะเวลาในการอบนาน 24-48 ชั่วโมง

เพื่อให้มีความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนำออกจากตู้อบแล้วให้เก็บผลผลิตไว้ในภาชนะที่สามารถป้องกันความชื้นและแสง หรือเก็บไว้ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพสุญญากาศ

Figure 10 สูตรอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าเพื่อให้เกิด Fruiting body

ลำดับ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ
1	ข้าวเจ้า	1 กิโลกรัม
2	มันฝรั่ง	200 กรัม
3	ข้าวโพดอ่อน	100 กรัม
4	ข้าวโพดอบ	75 กรัม
5	กลูโคส	10 กรัม
6	น้ำตาลทราย	15 กรัม
9	ดักแด้ใหม่	100 กรัม
10	ไข่ไก่ต้ม	100 กรัม
11	โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5 กรัม
12	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5 กรัม
15	น้ำสะอาด	1.2 ลิตร

ที่มา : (ดัดแปลงจากสูตรลงหุด ัญญา ทะพงค์แกม มงคล ยะไชย และวรรณพร ทะพงค์แก (2556)

3.5 การสกัดตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง

การสกัดตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองดัดแปลงจากวิธีการของ Huang และคณะ (2009) ซึ่งตัวอย่างดอกเห็ดที่อบแห้งแล้ว 1 กรัม มาบดให้ละเอียดหลังจากนั้นนำผงที่ได้มาแช่สกัดด้วย 50% เมทานอล 10 มิลลิตรเขย่าบนเครื่อง sonicator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 4 และทำการสกัดซ้ำในขั้นตอนนี้อีกหนึ่งครั้งเพื่อสกัดสารออกมามากที่สุด เก็บรวบรวมสารสกัดทั้ง 2 ครั้ง ใส่ขวดสีชาที่ 2-4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การวิเคราะห์

เก็บบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ดังนี้

- น้ำหนักเห็ดสดและแห้งเฉลี่ยต่อขวด (กรัม)

- ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด (มิลลิเมตร)
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/kg น้ำหนักแห้ง)
- ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg CE/kg น้ำหนักแห้ง)
- ปริมาณสารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ cordycepin และ adenosine (mg/kg น้ำหนักแห้ง)
- ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 2 วิธี DPPH และ FRAP

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตรวจวัดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay (Singleton and Rossi 1965) โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจึงแสดงในรูป mg ของ gallic acid/g น้ำหนักตัวอย่างแห้ง สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ความแตกต่างความเข้มข้นของ gallic acid เตรียมใน 80% methanol ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ตัวอย่าง 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และ สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (ที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้น 6 นาที เติม 7% sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader spectrophotometers (Synergy HT, Biotek instruments, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สารมาตรฐานที่ใช้ทำกราฟมาตรฐานคือ gallic acid เตรียมที่ความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วย mg GAE/kg น้ำหนักแห้ง

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในตัวอย่างตามวิธีการของ Dewanto และคณะ (2002) นำตัวอย่างมา 25 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย NaNO_2 (7%) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืด 5 นาที นำมาเติม AlCl_3 (10%) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที เติมสารละลาย 1 โมลาร์ NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 27.5 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บในที่มืด 5 นาที จากนั้น นำไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคำนวณโดยใช้ (+)-catechin เป็นสารมาตรฐาน (mg CE/kg dry weight) โดยใช้กราฟมาตรฐาน (+)-catechin เตรียมที่ความเข้มข้น 0-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine

วิเคราะห์ปริมาณ cordycepin และ adenosine ดัดแปลงจากวิธีการของ Huang และคณะ (2009) กรองสารสกัดที่ได้ผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงในขวดเก็บสาร

แยกและวิเคราะห์สารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ยี่ห้อ Shimadzu ที่ต่อกับคอลัมน์รุ่น C-18 (ขนาด 4.6 × 250 mm ที่มีอนุภาคขนาด 5 ไมครอน) และตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร สภาวะที่ใช้สำหรับการแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วยน้ำและเมทานอลในอัตราส่วน 80 : 20 โดยปริมาตร กำหนดให้ระบบคงที่ (isocratic) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์เท่ากับ 30°C ใช้สารมาตรฐาน cordycepin และ adenosine ของบริษัท Sigma Chemical Corporation โดยเตรียมในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร

- อุณหภูมิ Oven 40°C
- คอลัมน์ C-18 column, 250 × 4.6 มิลลิเมตร
- ตัวตรวจวัด Diode Array Detector (DAD)
- อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตรฉีด 20 ไมโครลิตร
- ตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร

3.6.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.4.1 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (DPPH scavenging activity)

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่รายงานโดย Nagai และคณะ (2005) มีวิธีทำโดยสุรุดังนี้ ปิเปิดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลทนาน 1 นาที จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง แบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH จากปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่ได้ใส่ส่วนสกัด ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH} = \frac{A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ทดสอบ}}}{A_{\text{ควบคุม}}} \times 100$$

แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

3.6.4.2 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างตรวจวัดได้โดยการใช้ออนุมูลอิสระเสถียร 2,4,6-tri (2-pyridyl)-tri-azine (TPTZ) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างด้วยสาร Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie and Strain 1996) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน คือ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดยเตรียมสารอนุมูลอิสระเสถียร FRAP ให้มีความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ น้ำเป็นตัวแทนทำละลาย นำมาผสมกับตัวอย่างในปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม microplate แล้วเติมสารละลาย FRAP reagent 270 ไมโครลิตร แต่ blank ให้เติม Acetate buffer ลงไปแทนสารละลาย FRAP reagent ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ วิธีการคำนวณทำเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แล้วรายงานค่าที่ได้ในรูป mg สมมูลของ FeSO_4 (mg Fe(II)/kg dry weight)

3.7 การหาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design

หลังจากคัดกรองปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญจากการทดลองที่แล้ว นำปัจจัยที่มีอิทธิพลมาศึกษาปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) แล้วทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตามสถานะที่กำหนดตามแบบการทดลอง CCD ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเหมือนกับการทดลองที่กล่าวมาเบื้องต้น เก็บข้อมูลมาก่อนสร้างสมการจำลอง พร้อมกับการสร้างพื้นที่ตอบสนอง (Response Surface Method, RSM) เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย เมื่อได้สมการจำลองของสถานะที่เหมาะสมแล้วทดสอบเลี้ยงเส้นใยให้ดูอีกครั้งเพื่อยืนยันว่าแบบจำลองใช้ได้ผลจริง

3.8 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.8.1 การสกัด

ดอกของเห็ดถั่งเช่าอายุ 60 วันถูกเก็บเกี่ยวแล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 เซลเซียสจนแห้ง จากนั้นบดให้ละเอียดแล้วสกัดโดยใช้ตัวทำละลายปริมาตร 1,000 มล. (EtOH และ EtOAc) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นแยกส่วนใสโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาทีและทำการสกัดซ้ำ รวบรวมส่วนใสที่ได้และปั่นหมุนเหวี่ยงที่

10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาทีอีกครั้ง กรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 4 แล้วทำการระเหยตัวทำละลายโดย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งแบบ Freeze-dried และเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลอง

3.8.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ATCC® HTB-22™ เซลล์ตับ HepG2 (ATCC® HB-8065™) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ATCC® CCL-2™ ได้มาจาก American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA) เซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดถูกเพาะเลี้ยงอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่เสริมด้วย 1500 มิลลิกรัมต่อลิตร L-glucose, 4mM L-glutamine, 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Streptomycin และ 10เปอร์เซ็นต์ Fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในฟาล์กเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันจนกว่าเซลล์จะได้ 80% confluency จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง จากนั้นทำการชะเซลล์ให้หลุดจากฟาล์กด้วย 0.25% Trypsin-EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจสอบเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) โดยใช้ Hemocytometer ทำการย้อมสีเซลล์ด้วยทริปแฟนบลู (Trypan blue) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.8.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Resazurin reduction microplate assay

เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ถูกนำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งถูกดำเนินการทดลองตามรายงานของ Kuete *et al.* (2013) ด้วยวิธี Resazurin reduction microplate assay (REMA) ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการปิเปตเซลล์มะเร็งที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัด (ความเข้มข้นสุดท้าย 0-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการแทนที่สารสกัดด้วยสารละลาย Resazurin ความเข้มข้น 0.001% ลงไปในแต่ละหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดระดับการเรืองแสง (Fluorescence) ที่ 530 nm excitation และ 590 nm emission wavelength โดยใช้เครื่อง fluorometer (Synergy 4HT Microplate Reader).

เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (Control) โดยรายงานเป็นค่า % Maximal cancer cell killing effect (E_{max}) คำนวณจาก $E_{max} = (\text{Control}_{ABS} - \text{Sample}_{ABS}) / \text{Control}_{ABS} \times 100$ และค่า IC_{50} คำนวณโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). ตามคำแนะนำสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Stair 1996)

3.8.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA, Analysis of Variance) แบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, Completely Randomized Design) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Rang test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) คัดเลือกปัจจัยโดยใช้ Plackett-Burman design และหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Central Composite Design ด้วยโปรแกรม Design Expert



บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกิ่งชำสีทอง โดย Plackett-Burman design

4.1.1 ผลของการใช้สารกระตุ้นต่อรูปร่าง ความยาว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของเห็ดกิ่งชำสีทอง

จากการศึกษาผลของการใช้สารกระตุ้น 7 ชนิด CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), ZnSO_4 (Zn^{2+}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), Salicylic acid, Gibberellic acid, L-phenylalanine โดย Plackett-Burman design ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 12 รัน ดัง (ตารางที่ 9) พบว่าความยาวสูงสุดคือ 8.16 ± 0.66 เซนติเมตร ในรันที่ 7 น้ำหนักสดสูงสุด 25.95 ± 5.77 กรัม ในรันที่ 5 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับรันอื่นๆ อีก 10 รัน ได้แก่ รันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12 มีเพียง 2 รัน ได้แก่ รันที่ 8 และ 10 ที่แตกต่างจากรันอื่นๆ รวมถึงลักษณะทางกายภาพของดอกที่มีความผิดปกติไปโดยที่พบว่าดอกเห็ดมีลักษณะเป็นทรงกลม ไม่เป็นเส้นยาวเหมือนรันอื่นๆ ดอกไม่แยกออกจากกัน จับตัวเป็นกลุ่มก้อน และบางดอกมีลักษณะหยิก งอ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและรันอื่น ๆ ดังแสดงใน (ภาพที่ 11)

ผลของสารกระตุ้นต่อ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่าการใช้สารกระตุ้นให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของการทดลองในรันที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12 ยกเว้นรันที่ 8 เช่นเดียวกับลักษณะทางกายภาพของดอก (ภาพที่ 11) ซึ่งในรันที่ 8 พบว่ามีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเพียง 1.98 ± 0.84 กรัม ดังแสดงใน (ตารางที่ 11)

ผลจากลักษณะทางกายภาพที่พบในการทดลองรันที่ 8 และ 10 ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช ซึ่งเมื่อพืชได้รับการกระตุ้นไม่ว่าจะเป็นสารกระตุ้นทางเคมี หรือทางชีวภาพที่มีปริมาณมากเกินไปหรือเมื่อพืชอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ พืชจะเกิดการตอบสนองต่อความเครียดโดยจะมีการเจริญเติบโตช้าลงจนทำให้ลักษณะทางกายภาพผิดแปลกไปจากเดิม แต่ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนไปกลับพบว่าพืชมีการสะสมสารอาหาร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญมากขึ้น

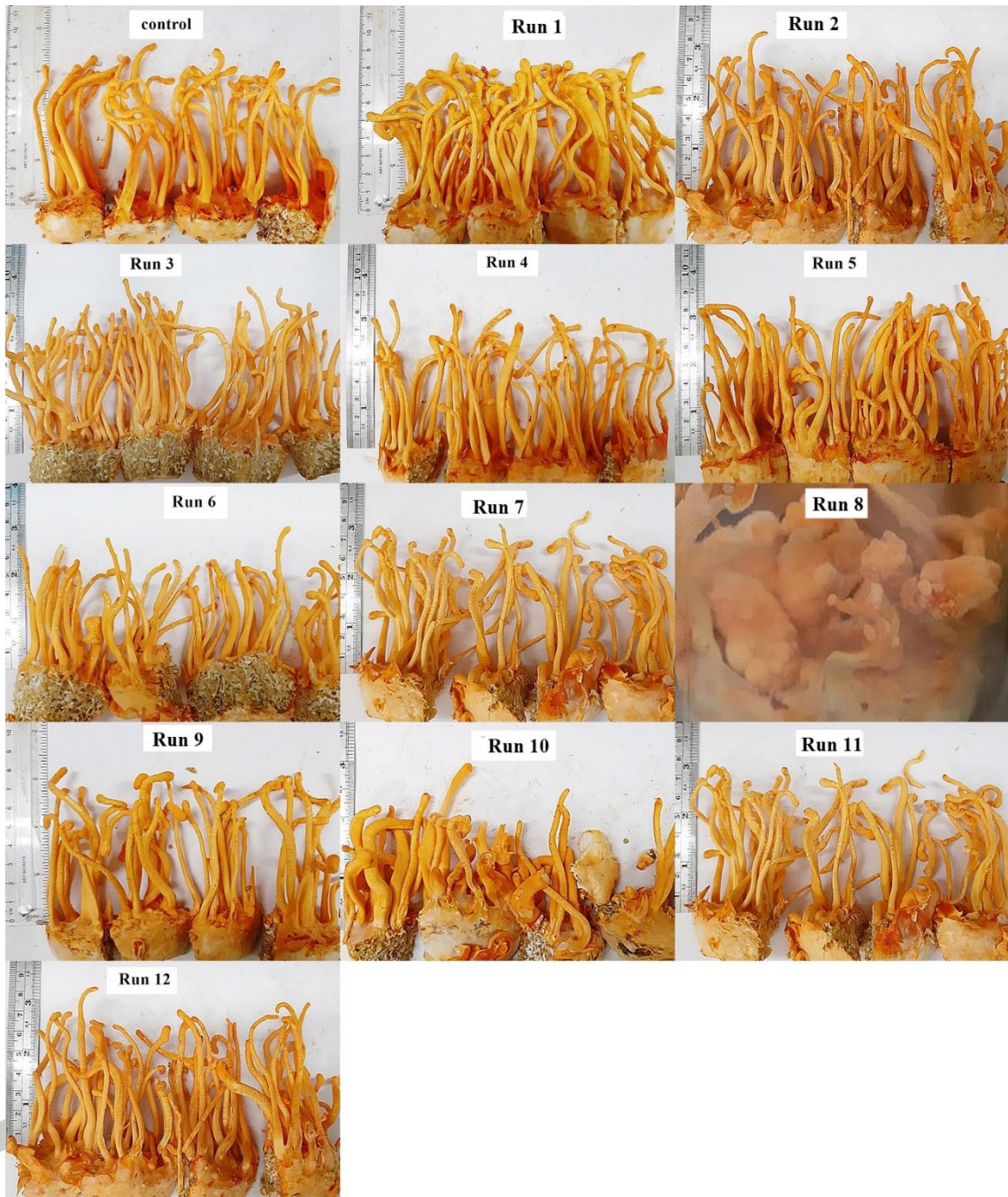


Figure 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดถึงเข้าสีทอง

พหุ มณฑล ภูเก็ต

Table 10 ผลของสารกระตุ้นต่อความยาว น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

รุ่น	ความยาวดอก (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
1	7.56±1.20 ^a	22.64±1.75 ^a	4.20±0.12 ^{ab}
2	6.71±0.77 ^a	25.35±1.74 ^a	4.23±0.45 ^{ab}
3	7.45±0.79 ^a	25.92±4.51 ^a	4.02±0.24 ^{abc}
4	7.70±1.00 ^a	22.29±2.28 ^a	4.20±0.50 ^{ab}
5	7.10±1.64 ^a	25.95±5.77 ^a	4.48±0.54 ^{ab}
6	6.92±0.80 ^a	23.02±4.21 ^a	4.09±0.17 ^{abc}
7	8.16±0.66 ^a	23.04±4.06 ^a	4.67±0.65 ^a
8	2.95±0.70 ^b	6.06±0.97 ^b	1.98±0.84 ^e
9	6.88±1.34 ^a	20.09±5.42 ^a	4.02±0.17 ^{abc}
10	3.00±0.71 ^b	22.16±1.57 ^a	3.28±0.40 ^d
11	6.55±0.29 ^a	21.66±1.99 ^a	4.22±0.65 ^{ab}
12	6.55±0.39 ^a	22.41±1.73 ^a	3.61±0.52 ^{abc}
ชุดควบคุม	7.62±0.12 ^a	19.48±1.50 ^a	3.60±0.12 ^{abc}

อักษร a,b,c ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.1.2 ผลของการใช้สารกระตุ้นต่อปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 12 รุ่น จากการออกแบบทดลองโดยใช้ Plackett-Burman design (ตารางที่ 9) พบว่ารุ่นที่ 8 ให้ปริมาณสารคอร์โดเซปินสูงที่สุดโดยเพิ่มขึ้นเป็น 2.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงใน (ตารางที่ 12) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 12 รุ่น จากการออกแบบทดลองโดยใช้ Plackett-Burman design (ตารางที่ 12) พบว่ารุ่นที่ 1 มีปริมาณอะดีโนซีนสูงที่สุดโดยเพิ่มขึ้นเป็น 2.2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังแสดงใน (ตารางที่ 12)

Table 11 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดย (HPLC)

รุ่น	Cordycepin (mg/kg dry weight)	Adenosine (mg/kg dry weight)
1	4,114.60 ± 1.29 ^g	1,375.99 ± 12.74 ^{bc}
2	4,714.63 ± 4.17 ^d	2,419.01 ± 16.70 ^a
3	2,349.45 ± 2.22 ^k	976.31 ± 23.13 ^f
4	3,751.31 ± 1.02 ^h	1,146.72 ± 4.58 ^{def}
5	2,132.17 ± 10.25 ⁱ	759.21 ± 11.81 ^g
6	1,850.04 ± 6.11 ^m	283.97 ± 1.61 ^g
7	3606.29 ± 0.90 ⁱ	972.34 ± 9.89 ^f
8	10,071.40 ± 8.97 ^a	1,208.20 ± 7.63 ^{cde}
9	4,192.37 ± 1.91 ^f	978.27 ± 3.17 ^f
10	8,588.93 ± 2.34 ^b	1,221.48 ± 8.51 ^{cde}
11	5,394.95 ± 7.25 ^c	1,074.46 ± 3.17 ^{ef}
12	3,140.62 ± 0.85 ^j	1,320.06 ± 1.3 ^{de}
control	4,550.01 ± 6.44 ^e	1,506.99 ± 5.37 ^{bc}

อักษร a-k ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



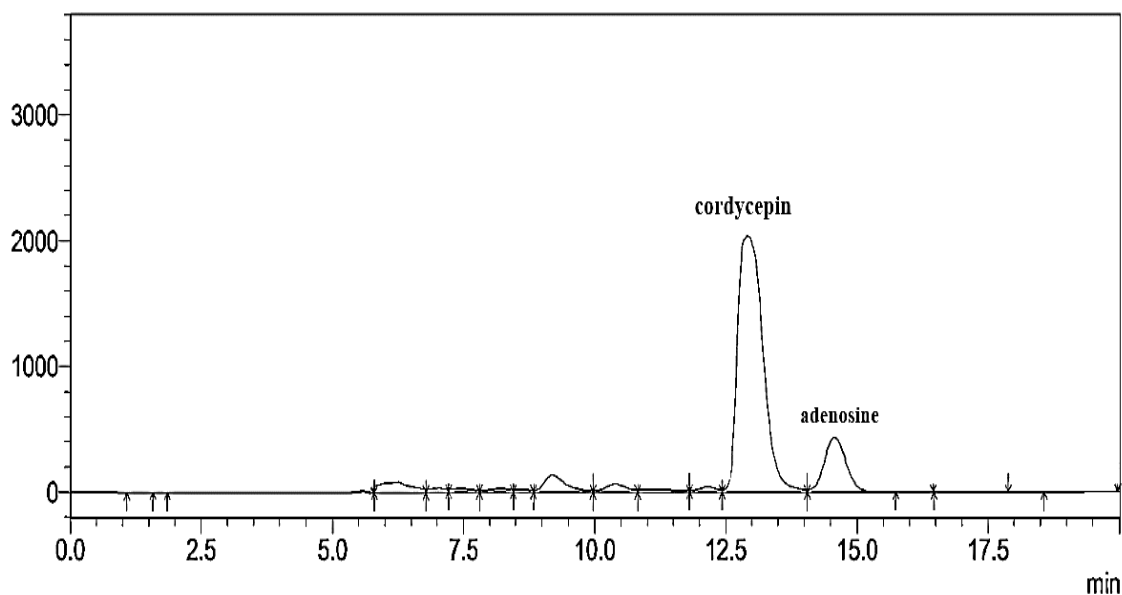


Figure 12 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.1.3 ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

4.1.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ประเภทหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด ในเห็ดถั่งเช่าสีทองก็เช่นเดียวกัน จากการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าการทดลองในวันที่ 8 จากการออกแบบการทดลองโดยใช้ Plackett-Burman design (ตารางที่ 13) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นมากที่สุด 1.3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าสารกระตุ้นที่เติมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่า ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นวันที่ 11 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

พูน ปณ ทิโต ชิว

Table 12 ผลของสารกระตุ้นต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Run	TPC (mgGAE/gDW)	TFC (mgRU/gDW)	DPPH (mgTE/gDW)	FRAP (mgFe(II)/gDW)
1	31.99±0.13 ^b	2.19±0.04 ^b	15.05±0.01 ^a	26.06±0.07 ^e
2	33.56±0.06 ^b	2.79±0.06 ^b	15.03±0.05 ^a	34.16±0.01 ^c
3	24.22±0.21 ^d	2.19±0.01 ^b	13.16±0.08 ^c	20.26±0.01 ^g
4	32.06±0.38 ^b	1.19±0.00 ^d	13.74±0.08 ^c	29.03±0.03 ^d
5	21.10±0.74 ^d	1.84±0.03 ^{bc}	13.21±0.07 ^c	19.83±0.02 ^g
6	16.71±0.50 ^d	0.99±0.03 ^d	13.18±0.05 ^c	21.68±0.01 ^g
7	28.55±0.10 ^{bc}	2.24±0.02 ^b	15.20±0.02 ^a	26.11±0.02 ^e
8	36.48±0.06 ^a	1.99±0.04 ^{bc}	15.36±0.03 ^a	45.36±0.01 ^{ba}
9	19.58±0.16 ^d	1.89±0.03 ^{bc}	15.08±0.00 ^a	24.54±0.04 ^f
10	29.32±0.25 ^{bc}	2.65±0.05 ^b	15.08±0.00 ^a	42.21±0.00 ^{ab}
11	24.80±0.21 ^d	3.40±0.11 ^a	14.26±0.02 ^b	24.89±0.01 ^f
12	27.46±0.17 ^c	1.93±0.19 ^{bc}	14.47±0.00 ^{ba}	24.26±0.02 ^f
control	27.93±0.14 ^c	3.39±0.14 ^a	14.32±0.00 ^b	24.52±0.00 ^f

อักษร a,b,c ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.1.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 12 รัน (Table 13) จากการออกแบบการทดลองโดยใช้ Plackett-Burman design พบว่า รันที่ 8 ให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH สูงที่สุด 15.36 มิลลิกรัม Trolox ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (Table 13)

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทั้ง 12 รัน (Table 13) จากการออกแบบการทดลองโดยใช้ Plackett-Burman design พบว่า รันที่ 8 ให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP สูงที่สุดที่ 45.36 มิลลิกรัม Fe(II) ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

Table 13 ผลการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ (regression analysis) แผนการทดลอง Plackett-Burman design สำหรับปริมาณคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารกระตุ้น ชนิดต่าง ๆ 7 ชนิด

สัญลักษณ์	effect	coefficient	Standard error	F	P
X1	+4169.85	1021.62	749.35	1.86	0.2445
X2	+1648.22	2208.61	749.35	8.69	0.0421*
X3	-3635.84	-727.17	749.35	0.94	0.3868
X4	+30.81	29.27	749.35	0.001	0.9707
X5	+2.48	17.40	749.35	0.005	0.9826
X6	-687.26	-859.09	749.35	1.31	0.3155
X7	+712.93	712.93	749.35	0.91	0.3953

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

Table 14 ผลการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ (regression analysis) แบบแผนการทดลอง (Plackett-Burman design) สำหรับปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารกระตุ้น ชนิดต่าง ๆ 7 ชนิด

สัญลักษณ์	effect	coefficient	Standard error	F	P
X1	+934.27	228.90	78.56	8.49	0.0435*
X2	+209.55	280.80	78.56	12.78	0.0233*
X3	+96.99	19.40	78.56	0.061	0.8171
X4	-44.51	-42.29	78.56	0.29	0.6189
X5	-20.18	-141.29	78.56	3.23	0.1465
X6	-123.95	-154.95	78.56	3.89	0.1198
X7	+151.06	151.07	78.56	3.70	0.1268

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จาก (ตารางที่ 14) และ (ตารางที่ 15) ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (regression analysis) แบบแผนการทดลอง Plackett-Burman design สำหรับปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน (adenosin) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้สารกระตุ้นต่างๆ 7 ชนิด ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), ZnSO_4 (Zn^{2+}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), Salicylic acid, Gibberellic acid, L-phenylalanine พบว่าการเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) มีผลต่อปริมาณที่เพิ่มขึ้นของสารคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่ปริมาณอะดีโนซีน (adenosine) (Table 15) พบว่าการเติมสาร CaCl_2 (X1) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) (X2) มีผลต่อปริมาณการเพิ่มขึ้นของสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สำหรับปริมาณคอร์โดเซปินที่เพิ่มขึ้นในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง เนื่องจากคอปเปอร์ (Cu^{2+}) เป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ต่างๆ ในวิถีเมตาบอลิซึมของถั่งเช่าสีทองช่วยทำให้เปลี่ยนโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์หรือซับสเตรตเพื่อให้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตทำงานได้ดีที่สุดในวิถีสังเคราะห์สารคอร์โดเซปิน (Figure 12) และยังพบว่าทั้ง CaCl_2 (Ca^{2+}) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณสารอะดีโนซีนที่เพิ่มขึ้นในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hung และคณะ (2015) ที่รายงานว่าไอออนโลหะหลายชนิดที่มีผลต่อการสร้างสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนของถั่งเช่าสีทอง ขณะที่ไอออนโลหะชนิด (Cl^-) MgCl_2 , NaCl , KCl , CaCl_2 , FeCl_2 ไม่มีผลต่อการสร้างคอร์โดเซปิน แต่สามารถกระตุ้นการสร้างสารอะดีโนซีนได้

นอกจากนั้นผลการศึกษานี้พบว่าแร่ธาตุก็มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ และการสร้างสารสำคัญ มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาผลของแร่ธาตุต่อการสร้างสารคอร์โดเซปินของถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) จากรายงานของ Fan และคณะ (2012) แสดงให้เห็นว่าไอออนโลหะหลายชนิด ได้แก่ Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} และ Fe^{2+} สามารถส่งเสริมการสร้างสารคอร์โดเซปินได้ สารดังที่กล่าวมานี้พบว่าไอออนโลหะชนิด Fe^{2+} มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการกระตุ้นการสร้างสารคอร์โดเซปิน โดยการใช้ที่ความเข้มข้น 1 g/L สามารถสร้างสารคอร์โดเซปินได้ถึง 596.59 ± 85.5 mg/L ซึ่งสูงกว่าการทดลองอื่นที่มีการเติม ferrous sulfate ขณะที่ไอออนโลหะชนิด Zn^{2+} มีผลอย่างมีนัยสำคัญในการลดของกระบวนการการสร้างสารคอร์โดเซปิน นอกจากนี้ Gu และคณะ (2007) ได้รายงานไว้ว่าการเติม Mn^{2+} ที่ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์หลายชนิด เช่น อะดีโนซีน กวานโนซีน และคอร์โดเซปิน

Hung และคณะ (2015) รายงานผลการศึกษามูลของไอออนโลหะหลายชนิดที่มีผลต่อการสร้างสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนของถั่งเช่าสีทอง พบว่า Mn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} และ NO_3^- สามารถกระตุ้นการสร้างสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนได้ แต่ในทางตรงกันข้ามกับไอออนโลหะชนิด Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} และ SO_4^{2-} จะกระตุ้นเฉพาะการสร้างสารอะดีโนซีนเท่านั้น ขณะที่

ไอออนโลหะชนิด Cl^- ($MgCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCl_2$, $FeCl_2$) ไม่มีผลต่อสร้างสารอะดีโนซีนแต่สามารถกระตุ้นการสร้างสารคอร์ไดเซปินได้ดี

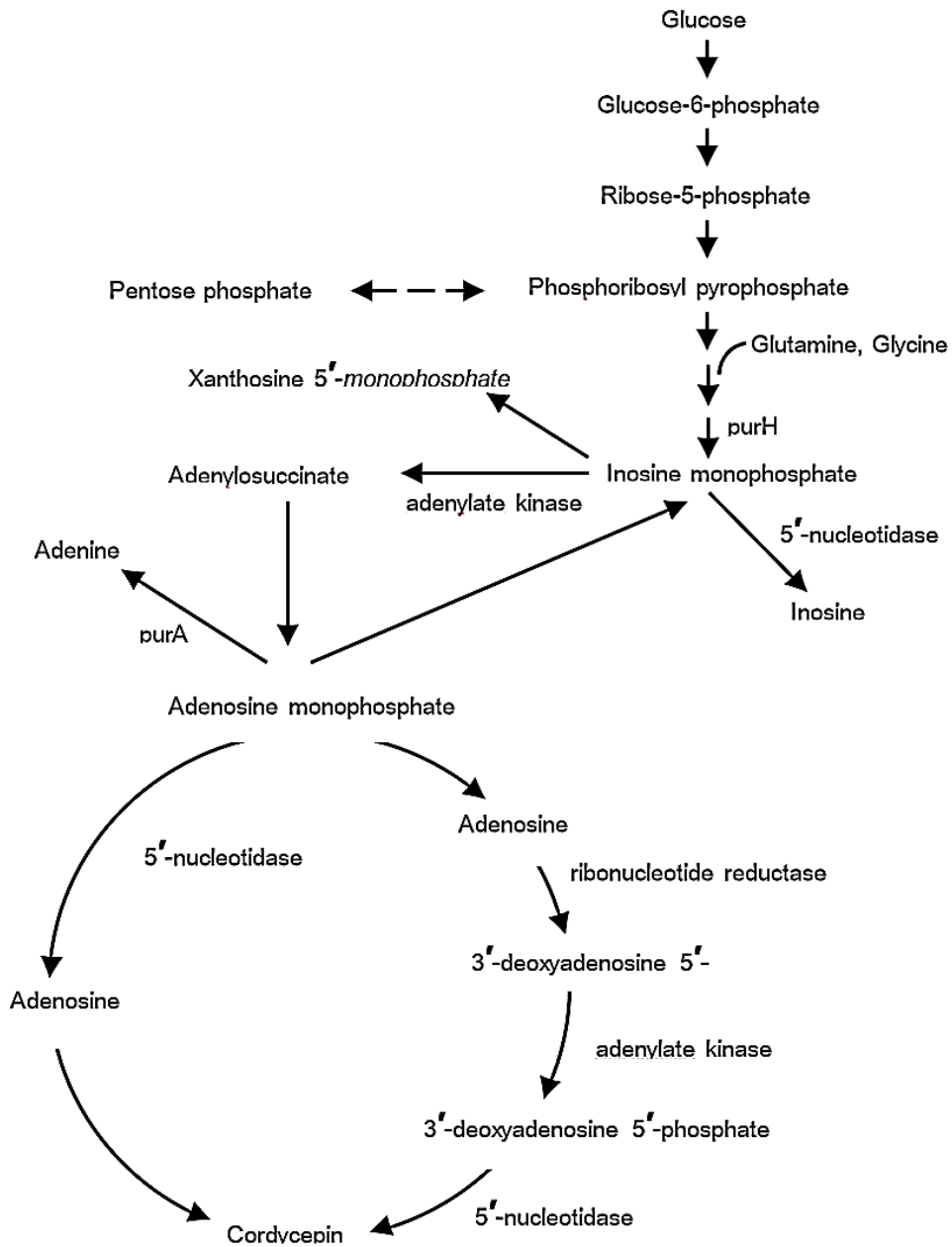


Figure 13 วิธีชีวสังเคราะห์ของสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน

Table 15 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA จากแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design

สัญลักษณ์ อิทธิพล	F-values														
	ลักษณะทางกายภาพ				นิเวศโอไซด์				ปริมาณฟีนอล		ปริมาณฟลาโวนอยด์		DPPH		FRAP (mg Fe(II)/g dw)
	ความยาว ดอก (cm)	น้ำหนัก เฉลี่ยดอก (g)	จำนวนดอก ต่อขวด (g)	น้ำหนักสด ต่อขวด (g)	น้ำหนักแห้ง ต่อขวด (g)	คอรีด เซปิน (mg/kg dw)	อะดินีนซีน (mg/kg dw)	ปริมาณฟีนอล ทั้งหมด (mg GAE/g dw)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด (mg RU/g dw)	% scavenging	TEAC/g dw				
X1 CaCl ₂ (Ca ²⁺) (g/L)	0.0014	0.0024	0.36	1.98	0.77	1.86	8.49*	1.60	0.98	1.39	1.35	0.089			
X2 CuSO ₄ ·5H ₂ O (Cu ²⁺) (mg/L)	0.090	0.087	0.23	1.06	0.26	8.69*	12.78*	3.96	1.51	0.69	0.68	0.38			
X3 ZnSO ₄ (Zn ²⁺) (mg/L)	0.53	0.24	0.0016	0.33	0.005	0.94	0.061	3.24	0.43	0.18	0.15	0.006			
X4 FeSO ₄ ·7H ₂ O (Fe ²⁺) (mg/L)	0.0001	0.0096	1.28	0.00166	0.35	0.0015	0.29	0.045	0.66	0.046	0.048	0.024			
X5 salicylic acid (mg/L)	0.19	0.000	0.001	1.71	0.30	0.0005	3.23	0.021	0.53	2.29	2.35	0.039			
X6 gibberlic acid (mg/L)	0.53	0.0096	3.43	0.81	0.57	1.31	3.89	2.86	0.84	0.31	0.31	1.36			
X7 L-phenylalanine (mg/L)	0.0029	0.70	0.40	0.67	0.63	0.91	3.70	2.19	0.55	2.33	2.35	0.64			

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

Table 16 คณะแผนผลรวมเชิงบวกของตัวแปรต่างๆ จากแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design สำหรับการศึกษาเพื่อหาปริมาณสารสกัดโดยใช้สารกระตุ้น

ปัจจัยลักษณะ	ลักษณะทางกายภาพ			นิเวศลิโอสเฟด		ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด		DPPH		ผลรวมผลกระทบบาง	
	น้ำหนักแห้ง	จำนวนดอก	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	คอร์เตอซิน	ฟีนอลิกทั้งหมด	RU/g dw	%scavenging	FRAP (mg Fe(II)/g dw)	ผลกระทบบาง	ผลกระทบบาง
ความยาวดอก (cm)	ดอกเดี่ยว	ดอกต่อช่อ	ช่อต่อช่อ	ช่อต่อช่อ	ช่อต่อช่อ	(mg GAE/g dw)	(mg TEAC/g dw)				
CaCl ₂ (Ca ²⁺)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	8	
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Cu ²⁺)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	10	
ZnSO ₄ (Zn ²⁺)	-	+	-	-	+	-	-	-	-	2	
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Fe ²⁺)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	6	
salicylic acid	-	-	-	+	+	-	-	-	-	2	
gibberellic acid	+	+	+	-	-	-	+	+	-	7	
L-phenylalanine	+	-	-	+	+	+	+	+	+	8	

- หมายถึง ผลกระทบบางเชิงลบ

+ หมายถึง ผลกระทบบางเชิงบวก

จากตารางที่ 17 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสร้างสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเห็ดถั่งเช่าสีทองอาศัยการออกแบบการทดลองโดยใช้ Plackett-Burman Design โดยพิจารณาจากผลของการใช้สารกระตุ้นชนิดต่างๆ (ตารางที่ 9) ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}) (X1), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) (X2), ZnSO_4 (Zn^{2+}) (X3), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}) (X4), Salicylic acid (X5), Gibberellic acid (X6) และ L-phenylalanine (X7)

เมื่อพิจารณาการเจริญโดยสังเกตจากลักษณะทางกายภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองได้แก่ ความยาวเฉลี่ยของดอก น้ำหนักสดเฉลี่ยต่อดอก จำนวนดอกต่อขวด น้ำหนักสดต่อขวด และน้ำหนักแห้งต่อขวด พบว่าสารกระตุ้นส่วนใหญ่มีผลเชิงลบต่อความยาวเฉลี่ยของดอกมีเพียง Gibberellic acid และ L-phenylalanine ที่ส่งผลในเชิงบวกต่อความยาวเฉลี่ยของดอก (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าสารกระตุ้นทั้งสองชนิดนี้มีส่วนกระตุ้นการเจริญของถั่งเช่าสีทอง ขณะที่สารกระตุ้นอื่นๆ มีผลในเชิงลบ อาจเนื่องมาจากการเติมสารในปริมาณมากเกินไปจึงส่งผลต่อความยาวของดอกได้ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Design Expert พบว่าไม่มีสารกระตุ้นชนิดใดที่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อความยาวเฉลี่ยของดอก ($p < 0.05$) นอกจากความยาวของดอกแล้ว สารกระตุ้นที่ใช้ในการทดลองยังมีผลในเชิงลบต่อจำนวนดอกเห็ดต่อขวดด้วยมีเพียง Gibberellic acid ซึ่งเป็นฮอร์โมนกระตุ้นส่งผลให้มีดอกถั่งเช่าสีทองเพิ่มขึ้นกับปริมาณที่ใช้ อย่างไรก็ตามสารกระตุ้นส่วนใหญ่กลับมีผลในเชิงบวกต่อน้ำสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยของดอกต่อขวด มีเพียง CaCl_2 (Ca^{2+}), salicylic acid และ L-phenylalanine ที่มีผลในเชิงลบ

จากการศึกษาายังพบว่าสารกระตุ้นที่ใช้ทั้งหมด 7 ชนิด มี 2 ชนิด คือ CaCl_2 (Ca^{2+}) (X1) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) (X2) เมื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลสหสัมพันธ์ แบบแผนการทดลอง (PBD) พบว่า สาร 2 ชนิดนี้มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) มีผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลของการใช้สารกระตุ้นที่ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างสารสำคัญ รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากตารางสรุปคะแนนโดยรวมพบว่า สารที่มีคะแนนโดยรวมสูงสุดได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), CaCl_2 (Ca^{2+}), และ L-phenylalanine ตามลำดับ ซึ่งสารกระตุ้นทั้งสามชนิดนี้จะนำไปศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการออกแบบการทดลองแบบผสมกลาง (Central composite design) ให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองต่อไป

4.2 ผลของสารสกัดหยาบ *Cordyceps militaris* ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

ผลของสารสกัดหยาบ *Cordyceps militaris* ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ด้วยวิธี REMA ผลแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า *Cordyceps militaris* ที่สกัดด้วย ETOH และ EtOAc มีฤทธิ์ยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน และยังมีขึ้นอยู่กับขนาดและปริมาณของสารสกัดด้วย (ภาพที่ 14 A-B) แสดงเป็นความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงสุดครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) (Table 18) *Cordyceps militaris* ที่สกัดด้วย EtOAc แสดงผลการยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง MCF-7 สูงสุดหลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ($IC_{50} = 33.64 \pm 0.78 \mu\text{g} / \text{mL}$) ตามด้วย EtOAc เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ($IC_{50} = 112.95 \pm 6.01 \mu\text{g} / \text{mL}$) และสกัดด้วย ETOH หลังการบ่มเวลา 48 ชั่วโมง ($IC_{50} = 112.35 \pm 3.04 \mu\text{g} / \text{mL}$) ตามลำดับ ส่วนในเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ มะเร็งปากมดลูก HeLa พบว่าสารสกัด *Cordyceps militaris* ที่ตัวทำละลายแตกต่างกันมีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ขึ้นอยู่กับขนาดอย่างมีนัยสำคัญ (4ภาพที่ 14 C-F) สารสกัดที่สกัดด้วย EtOAc จะมีกิจกรรมสูงสุดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ($IC_{50} = 63.99 \pm 13.01 \mu\text{g} / \text{mL}$) และ HeLa ($IC_{50} = 92.24 \pm 0.58 \mu\text{g} / \text{mL}$) หลังจากการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงตามลำดับ แสดงเป็น IC_{50} (ตารางที่ 18) สารสกัดด้วย EtOAc ยับยั้งการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งมากกว่าการสกัดด้วย ETOH อย่างไรก็ตามเซลล์ MCF-7 มีความไวต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดของสารสกัดที่สกัดด้วย EtOAc มากกว่า HepG2 และ HeLa

Table 17 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบ *Cordyceps militaris* ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

Treatment	time	Cell line					
		MCF-7		HepG2		HeLa	
		E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E_{max} (%)	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
ETOH	24 h	88.42±0.38 ^c	236.10±6.79 ^c	88.50±0.59 ^c	174.80±4.10 ^c	21.31±1.15 ^c	>500
	48 h	87.73±0.60 ^c	112.35±3.04 ^b	87.43±0.11 ^d	135.60±3.54 ^b	39.59±0.83 ^b	>500
EtOAc	24 h	91.21±0.71 ^b	112.95±6.01 ^b	92.48±0.13 ^b	134.20±2.69 ^b	90.83±1.18 ^a	237.25±9.69 ^a
	48 h	93.00±0.26 ^a	33.64±0.78 ^a	95.05±0.07 ^a	63.99±13.01 ^a	92.24±0.58 ^a	161.90±3.96 ^a

สัญลักษณ์ a-d หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$)

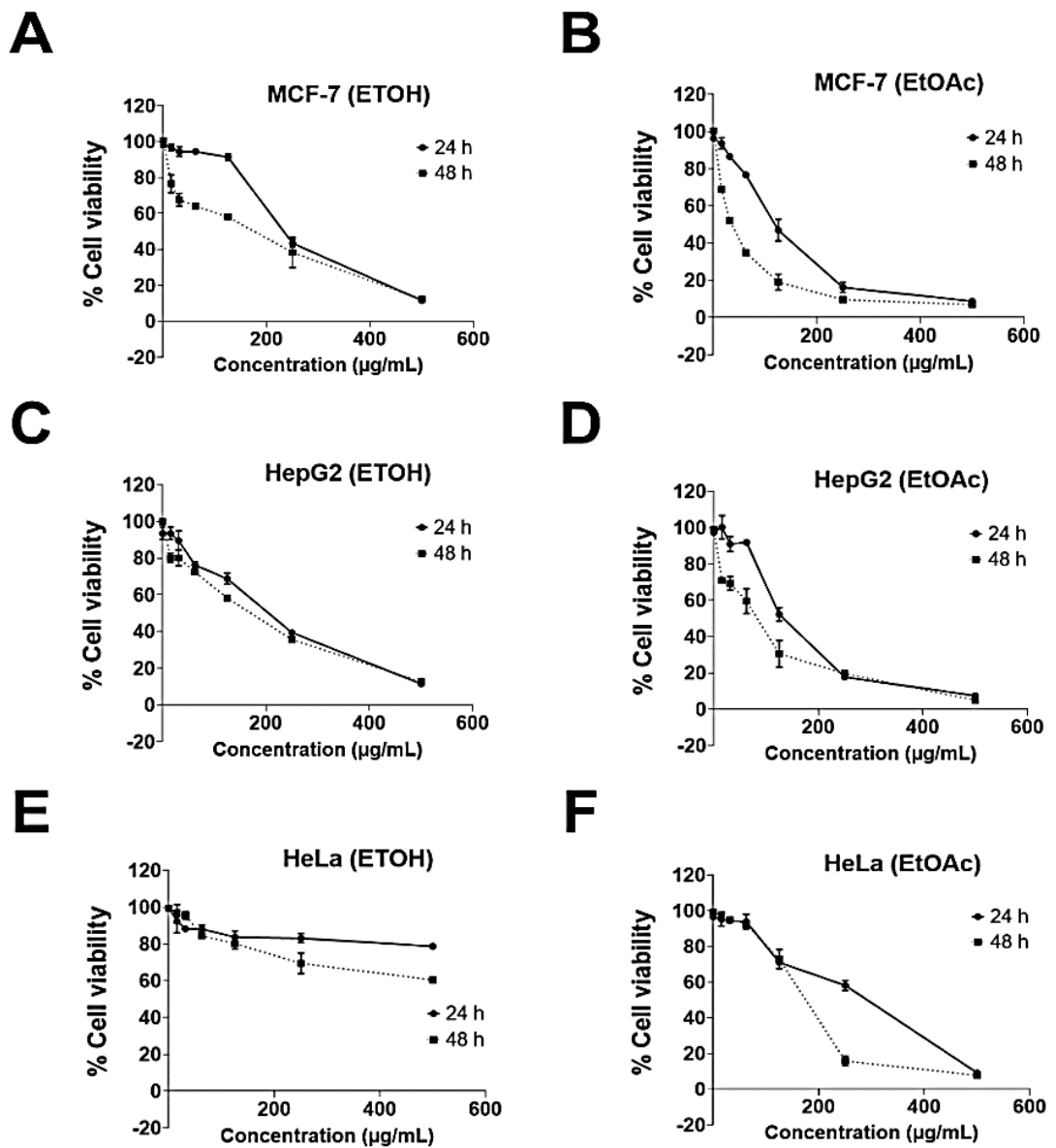


Figure 14 ผลของสารสกัด *Cordyceps militaris* จากตัวทำละลายที่แตกต่างกันต่อการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง, A-B; เซลล์มะเร็ง MCF-7, C-D; เซลล์มะเร็ง HepG2 และ E-F; เซลล์มะเร็ง HeLa แต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ของการทดลองสามครั้ง $p < 0.05$ เทียบกับตัวควบคุม

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ การสร้างสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากคัดกรองปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญ และการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), CaCl_2 (Ca^{2+}), และ L-phenylalanine มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญและสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จึงนำทั้ง 3 ปัจจัยมาศึกษาปัจจัยร่วมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ที่สำคัญเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดที่ดีที่สุดโดยใช้วิธี Response surface methodology (RSM) ใช้รูปแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ได้แก่ CaCl_2 (X_1 : 0.17-0.50 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (X_2 : 1.12-3.35 mg/L) และ L-Phenylalanine (X_3 : 0.84-2.50 mg/L) (ตารางที่ 19)

การออกแบบการทดลองตาม CCD ในงานวิจัยนี้ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง โดย 8 แพคทอเรียล 6 แกน และ 6 จุดกึ่งกลาง (Table 20) คำนวณจาก $N = 2^n + 2n + n_c$ โดยที่ N คือจำนวนการทดลอง n คือจำนวนตัวแปรอิสระ n_c คือจำนวนการทดลองซ้ำตำแหน่งกลาง (Montgomery, 2013) ข้อมูลจากชุดการทดลองวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของหลายปัจจัยต่อการเจริญ การสร้างสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าสีทองด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อประเมินความสอดคล้องของแบบจำลอง (Fitted model) โดยค่าความสอดคล้องของแบบจำลองตัดสินจาก R^2 และทดสอบนัยสำคัญของเทอมของแบบจำลองที่อยู่บนพื้นฐานของค่า p -value และ F -value พร้อมทั้งสร้างแบบจำลองทำนายผลการทดลองในรูปสมการพหุนามกำลังสอง (Quadratic Polynomial Equation) แสดงความสัมพันธ์ร่วมของแต่ละปัจจัย ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (William, Montgomery, and Runger 1999) ดังสมการที่ 1 และสภาวะที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม Design Expert

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{-----}(1)$$

เมื่อ y คือ การเจริญ การสร้างสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าสีทองที่ทำนายได้

β_0 คือค่าคงที่ β_i , β_{ii} , β_{iii} คือ สัมประสิทธิ์การถดถอย และ x_i , x_{ii} คือ ปัจจัยในการทดลอง

Table 18 ปัจจัยและระดับปัจจัยในการทดลอง

Factor	Level				
	-∞	-1	0	+1	+∞
CaCl ₂ (X1)	0.01	0.17	0.34	0.50	0.67
CuSO ₄ .5H ₂ O (X2)	0.01	1.12	2.24	3.35	4.46
L-Phenylalanine (X3)	0.01	0.84	1.67	2.50	3.33

Table 19 การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง

Run number	Factor		
	X1 (g/L)	X2 (mg/L)	X3 (mg/L)
1	0.17 (-1)	1.12 (-1)	0.84 (-1)
2	0.50 (1)	1.12 (-1)	0.84 (-1)
3	0.17 (-1)	3.35 (1)	0.84 (-1)
4	0.50 (1)	3.35 (1)	0.84 (-1)
5	0.17 (-1)	1.12 (-1)	2.50 (1)
6	0.50 (1)	1.12 (-1)	2.50 (1)
7	0.17 (-1)	3.35 (1)	2.50 (1)
8	0.50 (1)	3.35 (1)	2.50 (1)
9	0.01 (-2)	2.24 (0)	1.67 (0)
10	0.67 (2)	2.24 (0)	1.67 (0)
11	0.34 (0)	0.01 (-2)	1.67 (0)
12	0.34 (0)	4.46 (2)	1.67 (0)
13	0.34 (0)	2.24 (0)	0.01 (-2)
14	0.34 (0)	2.24 (0)	3.33 (2)
15	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)
16	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)
17	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)
18	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)
19	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)
20	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)

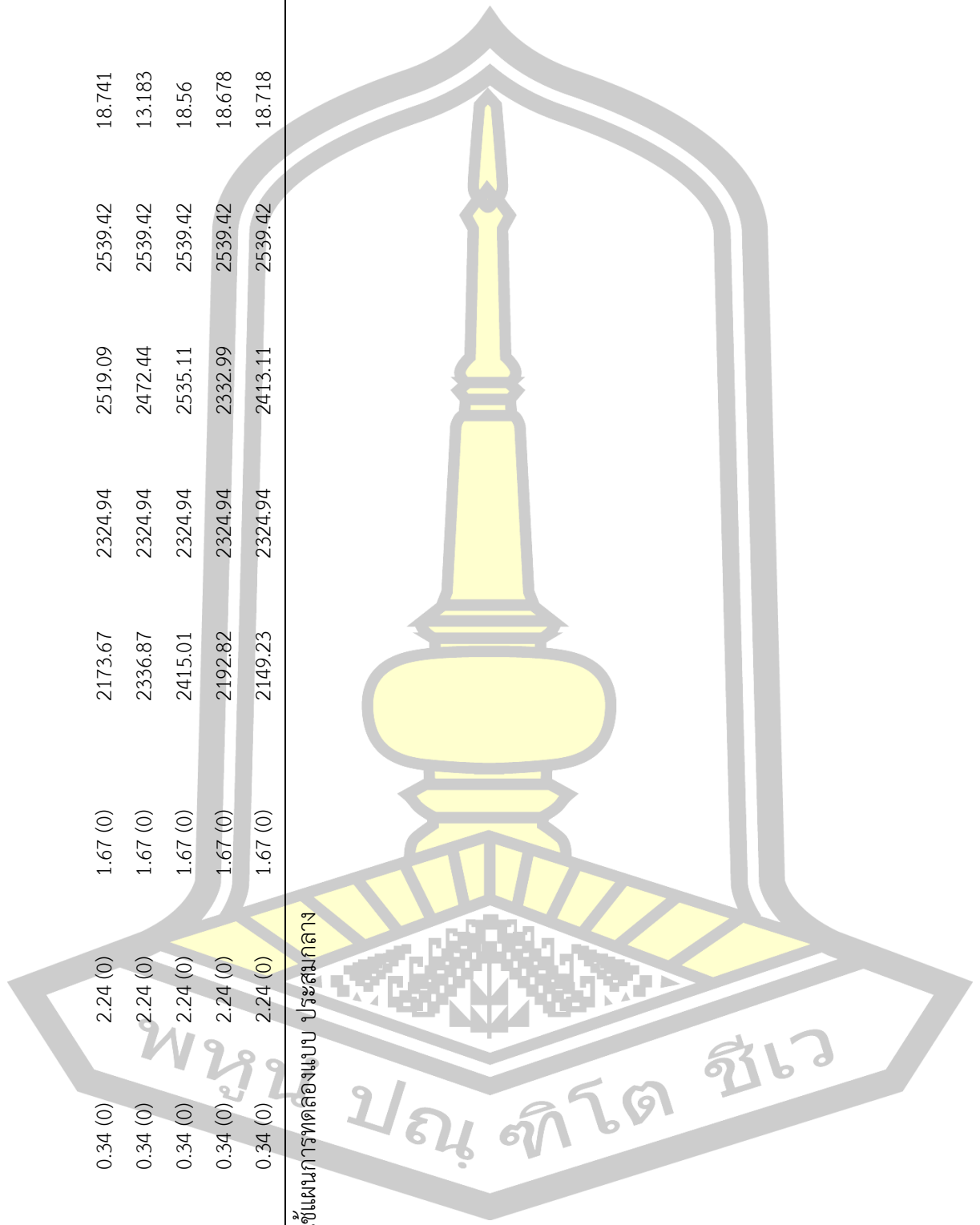
จากการศึกษาได้ผลการทดลองดังแสดง (ตารางที่ 20) จากนั้นทำการวิเคราะห์และแสดงผลการทดลองในรูปแบบผิวตอบสนองดังนี้

Table 20 ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารคอร์เดซิปีน อะดีโนซีน และกัวทีตามอนูคลอติสของเมล็ดงาข้าวลิ้นงูที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ

การทดลอง	สารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง		cordycepin (mg/kg)		Adenosine (mg/kg)		ปริมาณฟีนอลทั้งหมด (mg GAE/dw)		
	CaCl ₂ (g/L)	CuSO ₄ ·5H ₂ O (g/L)	L-Phenylalanine (mg/L)	การทดลอง	การทำนาย	การทดลอง	การทำนาย	การทดลอง	การทำนาย
1	0.17 (-1)	1.12 (-1)	0.84 (-1)	2613.25	2287.23	2420.99	2501.72	18.274	18.40
2	0.50 (1)	1.12 (-1)	0.84 (-1)	2447.26	2289.93	3037.82	2501.72	19.022	18.24
3	0.17 (-1)	3.35 (1)	0.84 (-1)	2435.37	2355.41	2853.2	2504.41	17.35	18.24
4	0.50 (1)	3.35 (1)	0.84 (-1)	1224.12	2357.81	2574.93	2569.90	16.577	17.79
5	0.17 (-1)	1.12 (-1)	2.50 (1)	1757.34	2288.12	1976.22	2572.29	14.116	18.40
6	0.50 (1)	1.12 (-1)	2.50 (1)	2295.5	2290.82	2892.6	2502.60	17.573	18.24
7	0.17 (-1)	3.35 (1)	2.50 (1)	1830.64	2356.32	3211.05	2505.30	16.749	18.24
8	0.50 (1)	3.35 (1)	2.50 (1)	2213.04	2358.72	2936.42	2570.80	15.969	17.79
9	0.01 (-2)	2.24 (0)	1.67 (0)	1943.86	2322.38	3142.06	2573.20	12.716	18.47
10	0.67 (2)	2.24 (0)	1.67 (0)	1629.67	2327.47	2463.61	2536.86	15.962	17.86
11	0.34 (0)	0.01 (-2)	1.67 (0)	1826.28	2250.14	2717.96	2541.95	18.07	18.47
12	0.34 (0)	4.46 (2)	1.67 (0)	1731.3	2385.91	3226.09	2464.63	19.354	17.85
13	0.34 (0)	2.24 (0)	0.01 (-2)	2433.4	2324.04	2480.37	2600.39	17.868	18.16
14	0.34 (0)	2.24 (0)	3.33 (2)	2907.72	2325.84	3053.66	2538.52	18.453	18.16
15	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2229.16	2324.94	2504.31	2540.32	18.332	18.16

16	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2173.67	2324.94	2519.09	2539.42	18.741	18.16
17	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2336.87	2324.94	2472.44	2539.42	13.183	18.16
18	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2415.01	2324.94	2535.11	2539.42	18.56	18.16
19	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2192.82	2324.94	2332.99	2539.42	18.678	18.16
20	0.34 (0)	2.24 (0)	1.67 (0)	2149.23	2324.94	2413.11	2539.42	18.718	18.16

โดยใช้แผนการทดลองแบบ ประสมกลาง



4.4 การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลเบื้องต้น

4.4.1 การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบสวนตกคางของข้อมูล ว่ามีการกระจายของค่าสวนตกคาง (ตารางที่ 14) พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าสวนตกคางจากการทดลองหาปริมาณสารคอร์โดเซปิน ปริมาณสารอะดีโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP) ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่แสดงสิ่งผิดปกติ สรุปได้ว่าค่าสวนตกคางมีการแจกแจงปกติ

4.4.2 การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล ดังแสดงใน (ตารางที่ 15) พบว่าสวนตกคางของผลการทดลองหาปริมาณสารคอร์โดเซปิน ปริมาณสารอะดีโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP) ไม่มีรูปแบบแน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปที่แน่นอนได้ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

4.4.3 การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน ดังแสดง (ตารางที่ 16) พบว่าสวนตกคางของผลการทดลองหาปริมาณสารคอร์โดเซปิน ปริมาณสารอะดีโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP) มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ทั้งทางบวก และลบ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน



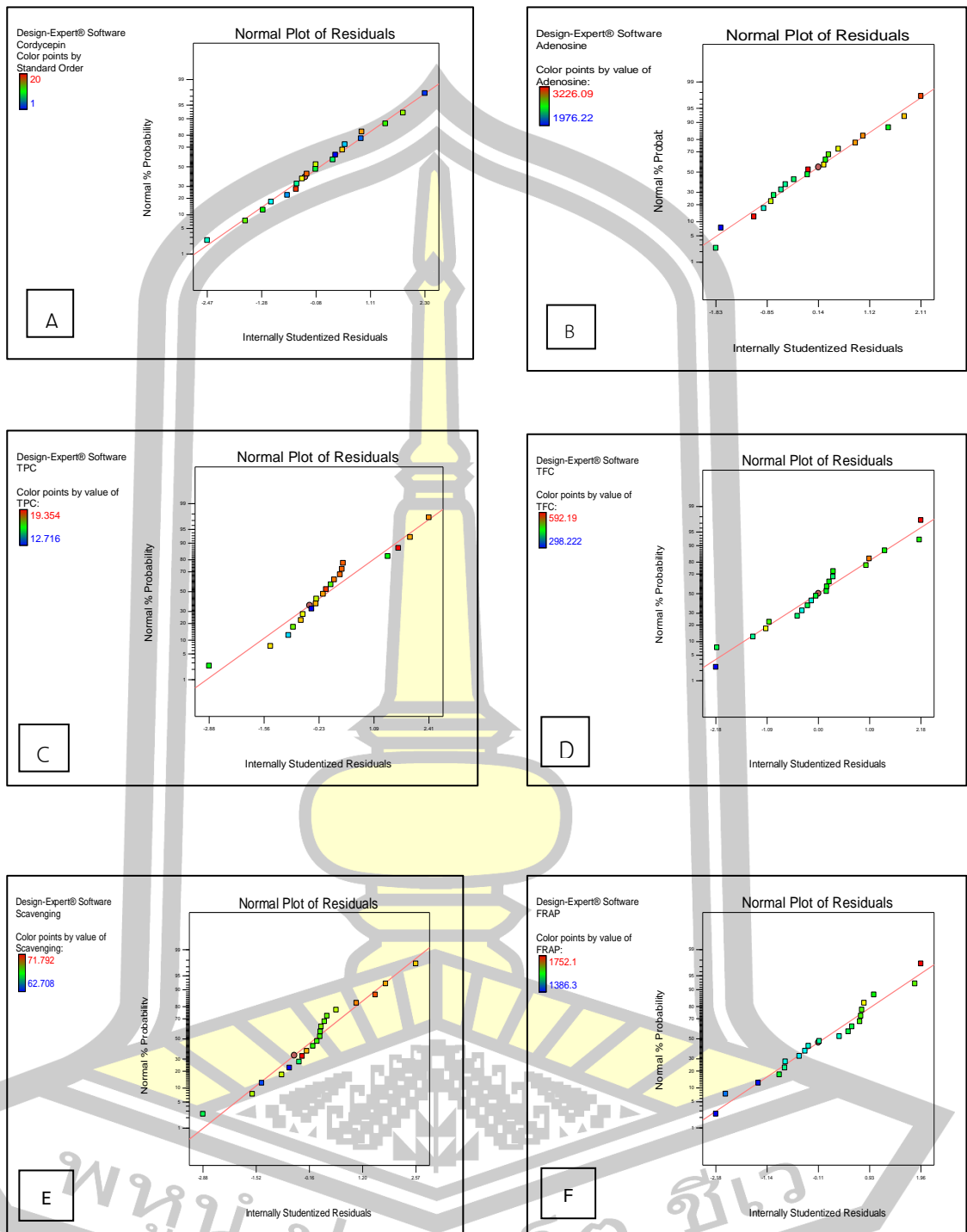


Figure 15 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของ (A) ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (B) ปริมาณสารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่า

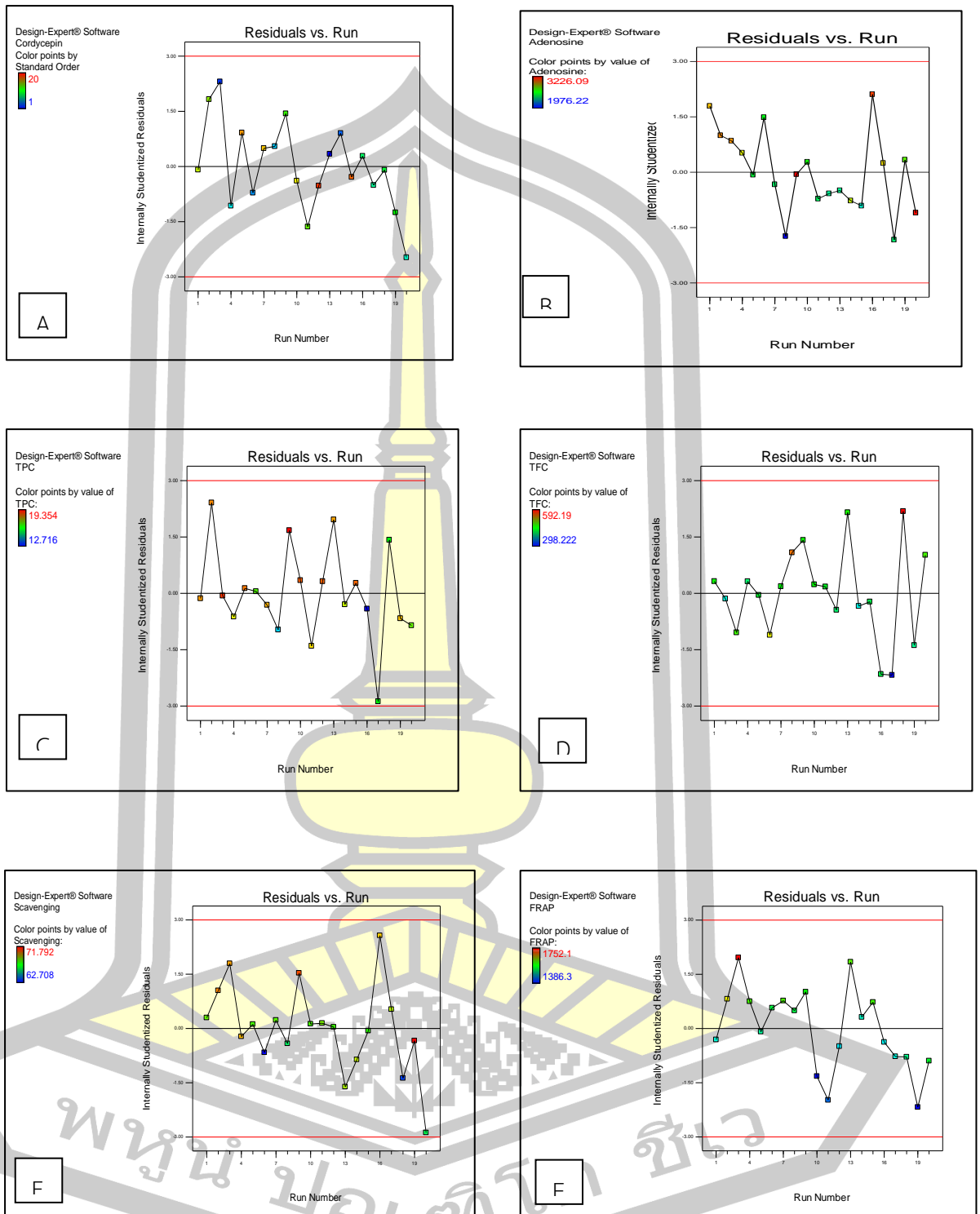


Figure 16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของ (A) ปริมาณสารคอร์โดเซปิน (B) ปริมาณสารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

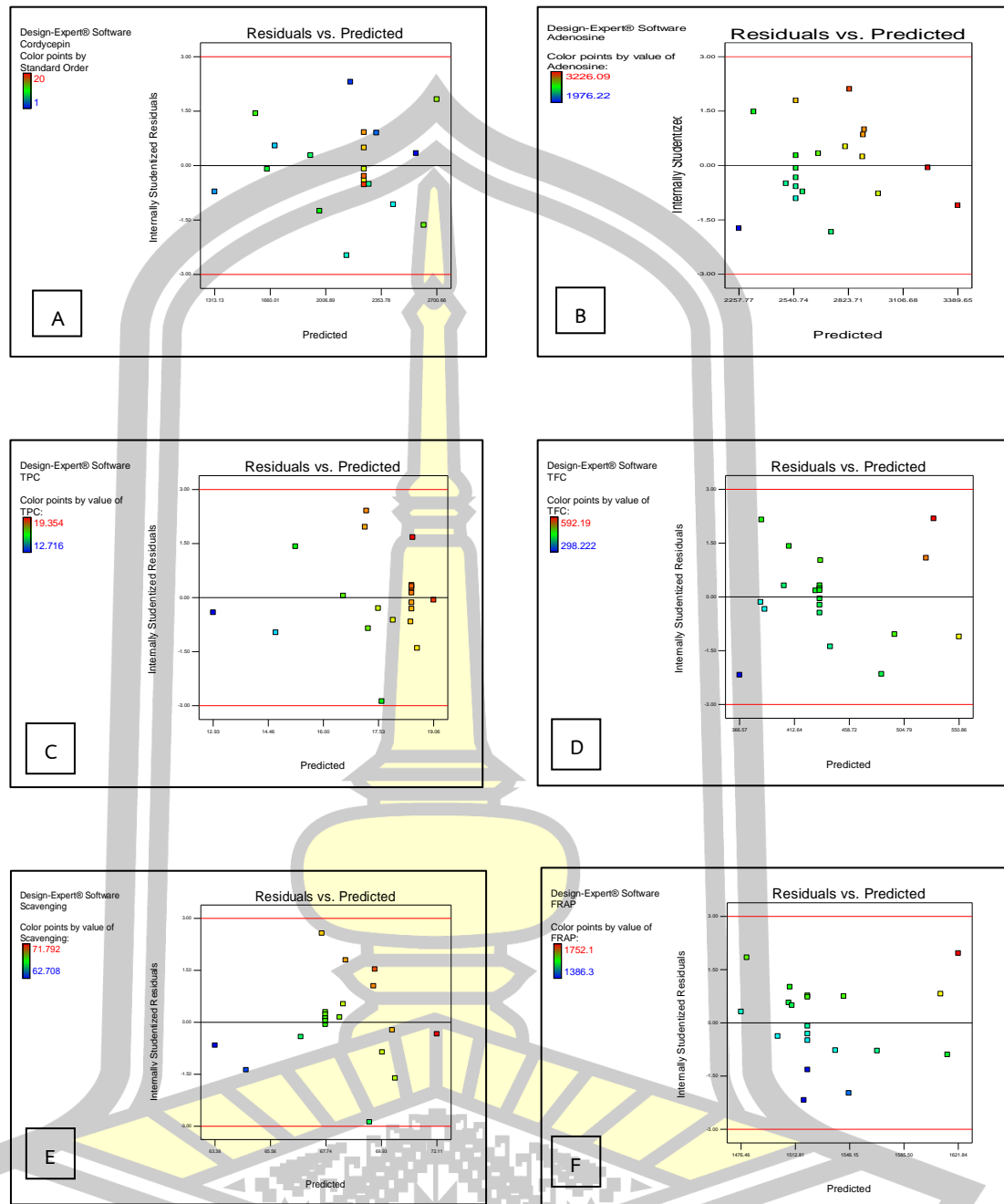


Figure 17 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย ของ (A)ปริมาณสารคอร์โดเซปิน (B)ปริมาณสารอะดีโนซีน (C) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (D) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด กุหลาบดำ อนุมูลอิสระ (E) DPPH (%Scavenging และ (F) FRAP ของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.5 สหสัมพันธ์สำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปิน และอะติโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ FRAP) ของการเพาะเลี้ยง เห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), CaCl_2 (Ca^{2+}), และ L-phenylalanine วิเคราะห์ค่าตอบสนองต่างๆ ได้แก่ ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน ปริมาณสารอะติโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี (DPPH และ FRAP) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลในรูปแบบพื้นผิวตอบสนอง จะได้ความสัมพันธ์ของปัจจัยและค่าตอบสนองซึ่งแสดงในรูปแบบของสมการโพลิโนเมียลอันดับสอง (second-order polynomial equation) แสดงดังสมการที่ 1

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{----- 1)}$$

เมื่อ y คือ ค่าตอบสนองต่างๆ ได้แก่ ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน ปริมาณสารอะติโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (DPPH และ FRAP) ที่ทำนายได้

β_0 คือ ค่าคงที่หรือสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของจุดตัด (intercept)

β_i คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear)

β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์กำลังสอง (quadratic)

β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์อันตรกิริยาระหว่างตัวแปร (interaction terms)

x_i, x_{ii} คือ ปัจจัยในการทดลอง ได้แก่ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), CaCl_2 (Ca^{2+}), และ L-phenylalanine

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้นในสถานะที่แตกต่างกัน สามารถหาความสัมพันธ์ในรูปแบบสมการที่ 1 ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปโดยใช้วิธี F-test และ t-test ในการหาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) ค่า F-value ค่า t-value และค่า p-value เพื่อบอกนัยสำคัญทางสถิติและนัยสำคัญของสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในสมการที่ 1 โดยพิจารณาจากความสัมพันธ์ระหว่าง CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ที่มีผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปิน ปริมาณสารอะติโนซีน ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (DPPH และ FRAP) จากการวิเคราะห์

ผลการทดลองทั้ง 20 ชุดการทดลองเพื่อหาอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมของการหีดั่งเช่าสีทองให้ได้การเจริญที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรม Design-expert จากผลการทดลองให้ผลดังนี้

Table 21 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์อิทธิพลสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณสารคอร์ไดเซปินในหีดั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	2245.95	2.478E+006	2.753E+005	6.81	0.0030
X ₁	-67.82	73584.70	73584.70	1.82	0.2071
X ₂	-100.01	1.600E+005	1.600E+005	3.96	0.0747
X ₃	20.32	6608.06	6608.06	0.16	0.6945
X ₁ X ₂	-150.13	1.803E+005	1.803E+005	4.46	0.0609
X ₁ X ₃	287.23	6.600E+005	6.600E+005	16.32	0.0024*
X ₂ X ₃	173.98	2.422E+005	2.422E+005	5.99	0.0344*
X ₁ ²	-117.43	3.467E+005	3.467E+005	8.57	0.0151*
X ₂ ²	-119.42	3.586E+005	3.586E+005	8.87	0.0139*
X ₃ ²	103.52	2.694E+005	2.694E+005	6.66	0.0274*
C.V. %					9.40
R ² of model					0.8597

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินในการเพาะเลี้ยงหีดั่งเช่าสีทอง ปัจจัยที่นำมาศึกษาคือ CaCl₂ (Ca²⁺), CuSO₄.5H₂O (Cu²⁺) และ L-phenylalanine มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนี้ X₁X₂, X₁X₃, X₂X₃, X₁², X₂², X₃² (Table 22) มีอิทธิพลร่วมต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งให้ค่า p -value เท่ากับ 0.0024, 0.0344, 0.0151, 0.0139, 0.0274 ตามลำดับ จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p -value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p -value > 0.05 จากผลการทดลองพบว่าได้ค่าถูกต้องทั้ง 2 ค่า ส่งผลให้การออกแบบการทดลองนี้สามารถใช้ได้ และได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังแสดงในสมการที่ 2

$$Y_{\text{ปริมาณคอร์ไดเซปิน}} = 2245.95 - 67.82X_1 - 100.01X_2 + 20.32X_3 - 150.13X_1X_2 + 287.23X_1X_3 + 173.98X_2X_3 - 117.43X_1^2 - 119.42X_2^2 + 103.52X_3^2 \text{ ----- (2)}$$

โดยที่ X_1 , X_2 และ X_3 คือ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ตามลำดับ

จากสมการที่ 2 จะเห็นได้ว่าอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลไปในเชิงบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าของปริมาณสารคอร์โคเซป็นสูงขึ้นตามไปด้วย

Table 22 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของสารอะดีโนซีน ในหัตถ์ถังเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	2460.43	1.724E+006	1.916E+005	4.25	0.0169
X_1	-23.54	8863.75	8863.75	0.20	0.6669
X_2	141.51	3.204E+005	3.204E+005	7.11	0.0236*
X_3	79.75	1.017E+005	1.017E+005	2.26	0.1639
X_1X_2	-260.76	5.440E+005	5.440E+005	12.07	0.0060*
X_1X_3	37.90	11490.52	11490.52	0.25	0.6245
X_2X_3	163.67	2.143E+005	2.143E+005	4.75	0.0542
X_1^2	83.79	1.765E+005	1.765E+005	3.92	0.0760
X_2^2	126.09	3.997E+005	3.997E+005	8.87	0.0139*
X_3^2	74.84	1.408E+005	1.408E+005	3.12	0.1076
C.V. %					7.90
R^2 of model					0.7928

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จากชุดการทดลองทั้งหมด ยังพบว่า CaCl_2 (Ca^{2+}) มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะดีโนซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 23) ซึ่งให้ค่า p-value เท่ากับ 0.0236 นอกจากนั้นยังพบว่า CaCl_2 (Ca^{2+}) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) ยังมีอิทธิพลร่วมต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารอะดีโนซีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วยซึ่งให้ค่า p-value เท่ากับ 0.0060 และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p-value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p-value > 0.05 จากผลการทดลองพบว่าได้ค่าถูกต้องทั้ง 2 ค่า ส่งผลให้การออกแบบการทดลองนี้สามารถใช้ได้ และได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังแสดงในสมการที่ 3 ดังนี้

$$Y_{\text{อะดีโนซีน}} = 2460.43 - 23.54X_1 + 141.51X_2 + 79.75X_3 - 260.76X_1X_2 + 37.90X_1X_3 + 163.67X_2X_3 + 83.79X_1^2 + 126.09X_2^2 + 74.84X_3^2 \text{ -----(3)}$$

โดยที่ X_1 , X_2 และ X_3 คือ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ตามลำดับ จากสมการที่ 3 จะเห็นได้ว่าอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลไปในเชิงบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าของปริมาณอะดีโนซีนสูงขึ้นตามไปด้วย

Table 23 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟีโนลิก ทั้งหมด ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	18.45	46.26	5.14	5.97	0.0050
X_1	0.57	5.23	5.23	6.07	0.0335*
X_2	0.014	3.249E-003	3.249E-003	3.771E-003	0.9522
X_3	-0.35	1.99	1.99	2.31	0.1593
X_1X_2	-0.72	4.14	4.14	4.81	0.0530
X_1X_3	0.34	0.91	0.91	1.06	0.3276
X_2X_3	0.55	2.42	2.42	2.81	0.1248
X_1^2	-1.09	30.04	30.04	34.86	0.0002*
X_2^2	2.614E-004	1.718E-006	1.718E-006	1.994E-006	0.9989
X_3^2	-0.14	0.48	0.48	0.55	0.4743
C.V. %					5.32
R^2 of model					0.8430

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จากการศึกษาพบว่าผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด พบว่าจากชุดการทดลอง 20 การทดลอง CaCl_2 (Ca^{2+}) มีอิทธิพลต่อปริมาณฟีโนลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งให้ค่า p -value เท่ากับ 0.0033 (Table 24) และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p -value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p -value > 0.05 จากผลการทดลองพบว่าได้ค่าถูกต้องทั้ง 2 ค่า ส่งผลให้การออกแบบการทดลองนี้สามารถใช้ได้ และได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังแสดงในสมการที่ 4 ดังนี้

$$Y_{\text{ฟีนอลิกทั้งหมด}} = 18.45 + 0.57X_1 + 0.014X_2 - 0.35X_3 - 0.72X_1X_2 + 0.34X_1X_3 + 0.55X_2X_3 - 1.09X_1^2 - ((2.614 \times 10^3) - 0.04)X_2^2 - 0.14X_3^2 \text{ -----(4)}$$

จากสมการที่ 4 จะเห็นได้ว่าอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลไปในเชิงบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าวจะทำให้ค่าของปริมาณฟีนอลิกสูงขึ้นตามไปด้วย

Table 24 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	433.82	49434.02	5492.67	2.12	0.1284
X_1	10.95	1919.25	1919.25	0.74	0.4094
X_2	-8.65	1197.42	1197.42	0.46	0.5118
X_3	-11.51	2118.92	2118.92	0.82	0.3869
X_1X_2	12.86	1322.45	1322.45	0.51	0.4911
X_1X_3	-57.78	26706.26	26706.26	10.32	0.0093*
X_2X_3	-22.86	4179.59	4179.59	1.61	0.2326
X_1^2	18.46	8564.25	8564.25	3.31	0.0989
X_2^2	-2.10	110.84	110.84	0.043	0.8402
X_3^2	-6.62	1103.00	1103.00	0.43	0.5286
C.V. %					11.52
R^2 of model					0.6563

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของ ปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่า (X_1X_3) CaCl_2 และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ มีอิทธิพลร่วมต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วยซึ่งให้ค่า p-value เท่ากับ 0.0093 (Table 25) แต่จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p-value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p-value > 0.05 จากผลการทดลองพบว่าค่าทั้ง 2 ไม่ถูกต้องตามเงื่อนไขส่งผลให้สมการการทำนายไม่สามารถนำไปใช้ได้

Table 25 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%scavenging) ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	68.37	73.83	8.20	3.05	0.0485
X ₁	-0.74	8.88	8.88	3.30	0.0992
X ₂	-0.61	5.94	5.94	2.21	0.1679
X ₃	0.33	1.78	1.78	0.66	0.4350
X ₁ X ₂	-1.16	10.70	10.70	3.98	0.0740
X ₁ X ₃	1.39	15.35	15.35	5.71	0.0380*
X ₂ X ₃	0.80	5.15	5.15	1.92	0.1965
X ₁ ²	-0.59	4.17	4.17	1.55	0.2414
X ₂ ²	0.61	15.73	15.73	5.85	0.0361*
X ₃ ²	0.12	2.36	2.36	0.88	0.3707
C.V. %					2.40
R ² of model					0.7331

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ผลของสารกระตุ้นต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%scavenging) ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของ CaCl₂ (Ca²⁺) มีอิทธิพลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%scavenging) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งให้ค่า p-value เท่ากับ 0.0361 (Table 26) และ (X₁X₃) CaCl₂ และ CuSO₄.5H₂O มีอิทธิพลร่วมต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%scavenging) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วยซึ่งให้ค่า p-value เท่ากับ 0.0380 และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p-value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p-value > 0.05 จากผลการทดลองพบว่าได้ค่าถูกต้องทั้ง 2 ค่า ส่งผลให้การออกแบบการทดลองนี้สามารถใช้ได้ และได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังแสดงในสมการที่ 5 ดังนี้

$$Y_{\text{DPPH (\%scavenging)}} = 67.72 - 0.74X_1 - 0.61X_2 + 0.33X_3 - 1.16X_1X_2 + 1.39X_1X_3 + 0.80X_2X_3 - 0.41X_1^2 + 0.79X_2^2 + 0.31X_3^2 \quad \text{-----}(5)$$

จากสมการที่ 5 จะเห็นได้ว่าอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร X_1 , X_2 และ X_3 มีอิทธิพลไปในเชิงบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงขึ้นตามไปด้วย

Table 26 ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง

สัญลักษณ์	coefficient	Sum of squares	Mean square	F	P
Intercept (β_0)	1520.99	31866.38	3540.71	0.31	0.9557
X_1	16.64	4428.90	4428.90	0.38	0.5502
X_2	-2.35	88.36	88.36	7.626E-003	0.9321
X_3	15.37	3782.25	3782.25	0.33	0.5804
X_1X_2	-27.42	6017.04	6017.04	0.52	0.4876
X_1X_3	-26.72	5713.80	5713.80	0.49	0.4986
X_2X_3	26.98	5821.21	5821.21	0.50	0.4946
X_1^2	3.32	277.21	277.21	0.024	0.8802
X_2^2	-1.79	80.74	80.74	6.968E-003	0.9351
X_3^2	14.58	5346.94	5346.94	0.46	0.5124
C.V. %					7.02
R^2 of model					0.2157

* หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากแผนการทดลองแบบประสมกลาง พบว่าไม่มีสารกระตุ้นชนิดใดมีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 27) จึงทำให้การออกแบบการทดลองนี้ไม่สามารถนำไปใช้สร้างสมการสำหรับทำนายการทดลองได้เช่นเดียวกันกับผลของสารกระตุ้นต่อปริมาณฟลาโวนอยด์

4.6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของสารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้สารกระตุ้น

จากข้อมูลผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการอันดับสองทำให้ได้สมการจำลองสามารถแสดงในรูปแบบของกราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) ที่จะแสดงอิทธิพลร่วมของสารกระตุ้นทั้งสามชนิดได้แก่ (CaCl_2 และ Cu_2SO_4),

(CaCl₂ และ L-phenylalanine), (Cu₂SO₄ และ L-phenylalanine) ต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปิน สารอะดีโนซีน สารฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดังนี้

4.6.1 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

อิทธิพลร่วมของ CaCl₂ และ Cu₂SO₄ เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดง ใน (ภาพที่ 18) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของ ปริมาณคอร์ไดเซปินที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl₂ และ Cu₂SO₄ โดย ปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.34-0.42 g/L และ 2.24-2.79 mg/L ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วง ดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดที่ 2,170 mg/kg

อิทธิพลร่วมของ CaCl₂ และ L-phenylalanine เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 19) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของ ปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่เพิ่มขึ้นโดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl₂ และ L-phenylalanine โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.17 - 0.34 g/L และ 2.24 - 2.79 mg/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดที่ 2,448 mg/kg

อิทธิพลร่วมของ L-phenylalanine และ Cu₂SO₄ เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 20) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของ ปริมาณคอร์ไดเซปินที่เพิ่มขึ้น เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีการเติม L-phenylalanine และ Cu₂SO₄ โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.84 - 1.25 mg/L และ 1.12 - 2.24 mg/L ตามลำดับ และจะ ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดที่ 2,300.92 mg/kg

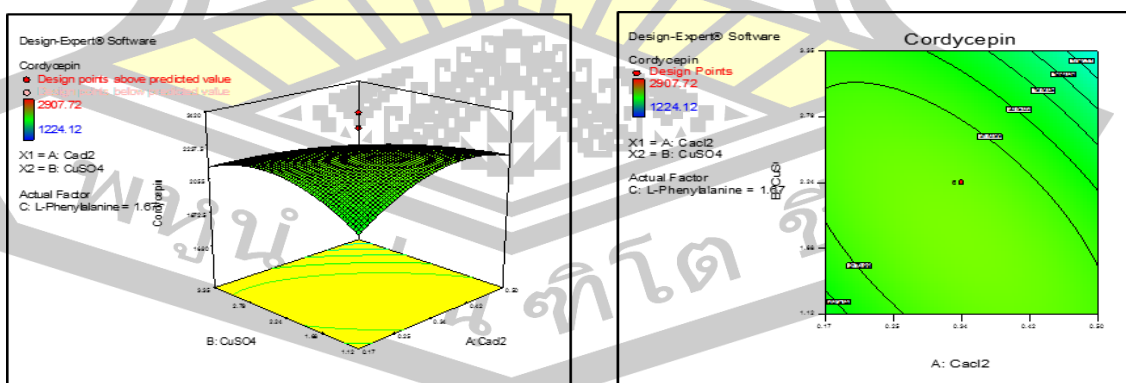


Figure 18 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ CaCl₂ และ Cu₂SO₄ ต่อปริมาณคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

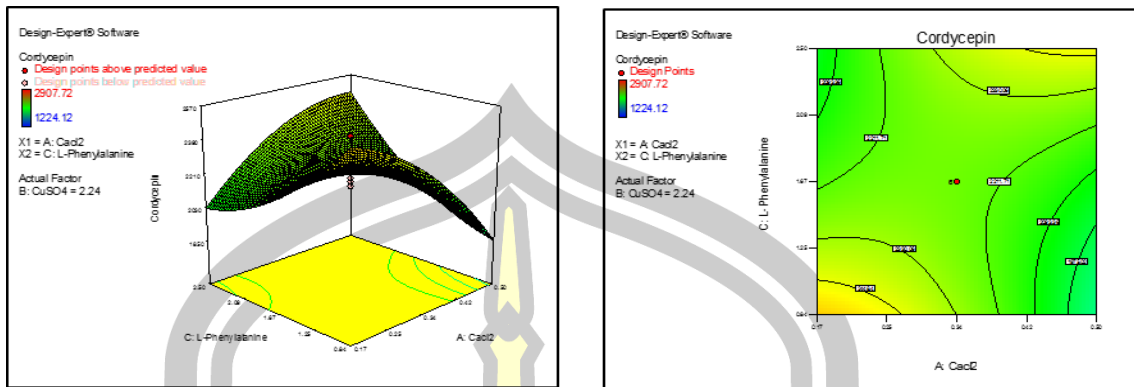


Figure 19 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanine ต่อปริมาณคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

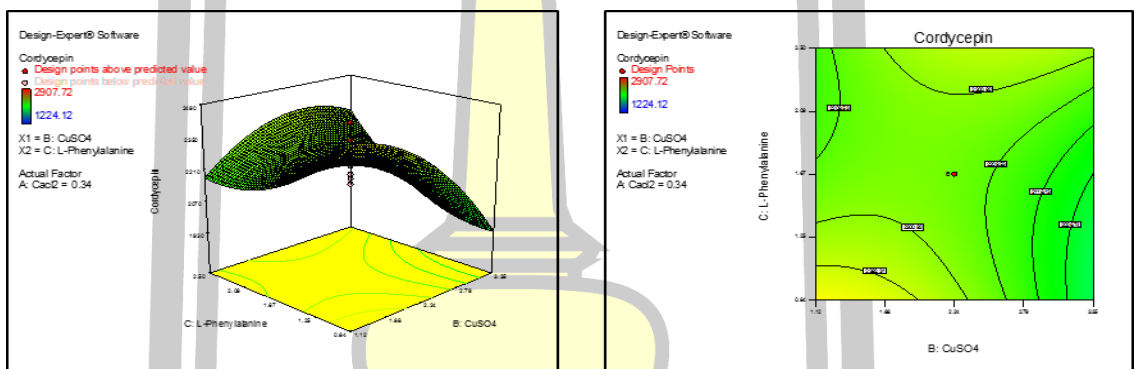


Figure 20 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanine ต่อปริมาณคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.6.2 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณสารอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 21) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสารอะดีโนซีนที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.17 - 0.25 g/L และ 2.09-2.50 mg/L ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดที่ 2,962.03 mg/kg

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanine เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 22) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสารอะดีโนซีนที่เพิ่มขึ้นโดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ

L-phenylalanine โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.17 - 0.25 g/L และ 2.09 - 2.59 mg/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดที่ 2,573 mg/kg

อิทธิพลร่วมของ L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 23) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของ สารอะดีโนซีนที่เพิ่มขึ้น เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีการเติม L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 โดย ปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 2.79 - 3.35 mg/L และ 2.09 - 2.50 mg/L ตามลำดับ และจะได้ ปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดที่ 2,873.2 mg/kg

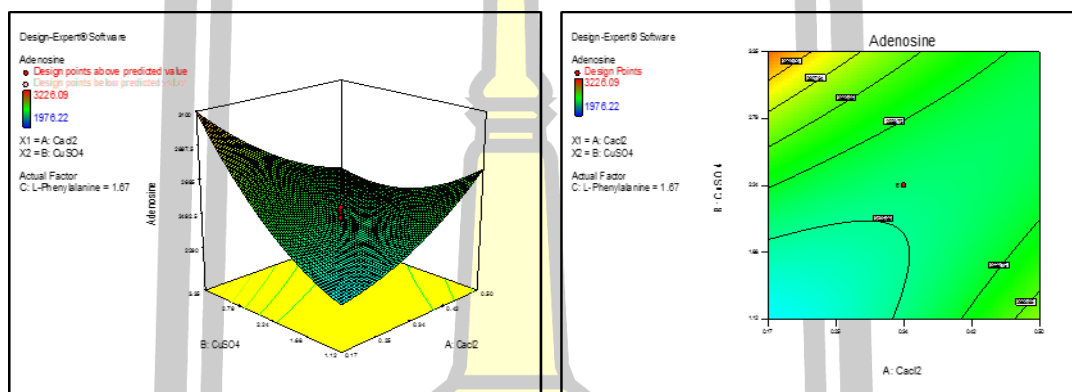


Figure 21 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

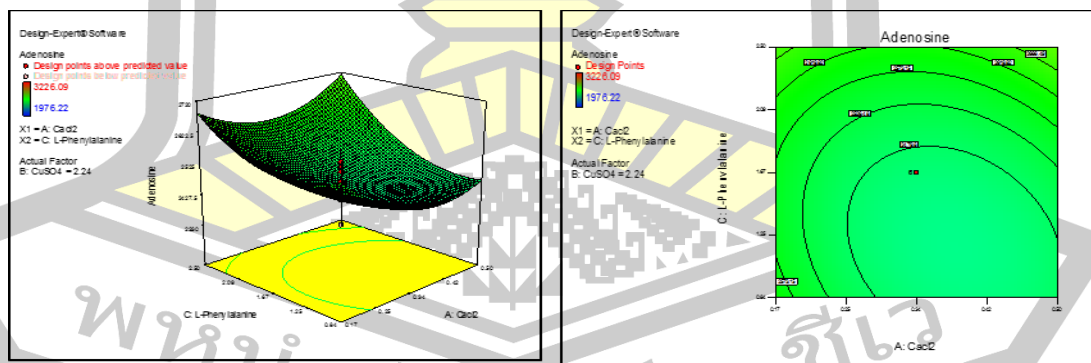


Figure 22 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดง อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

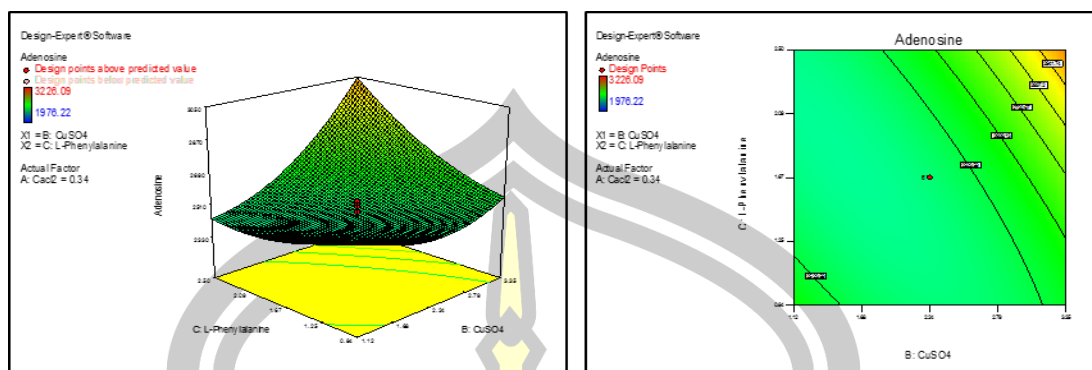


Figure 23 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

4.6.3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 24) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.17 - 0.34 g/L และ 1.12 - 3.35 mg/L ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 18.35 mgGAE/gDW

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanine เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 25) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นโดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ L-phenylalanine โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.25 - 0.42 g/L และ 0.84 - 2.4 mg/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 18.22 mgGAE/gDW

อิทธิพลร่วมของ L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 26) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีการเติม L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.84 - 1.25 mg/L และ 1.12-1.68 mg/L ตามลำดับ และจะได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดที่ 18.8 mgGAE/gDW

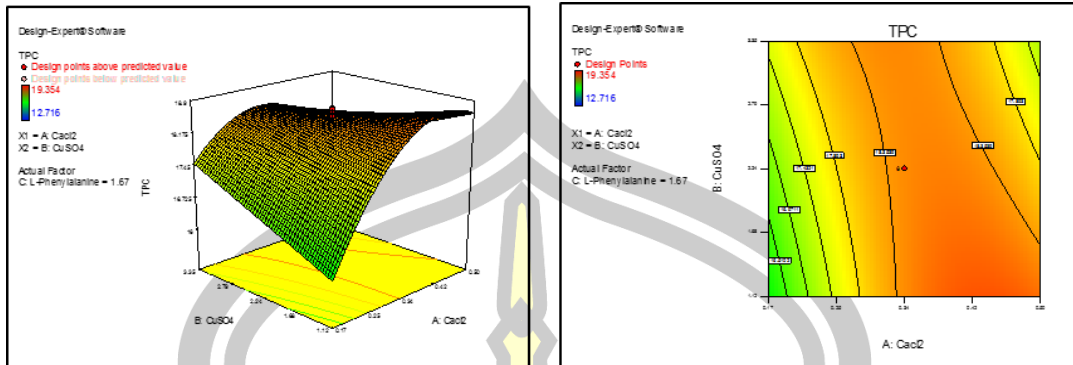


Figure 24 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อปริมาณพินอลิกทั้งหมด

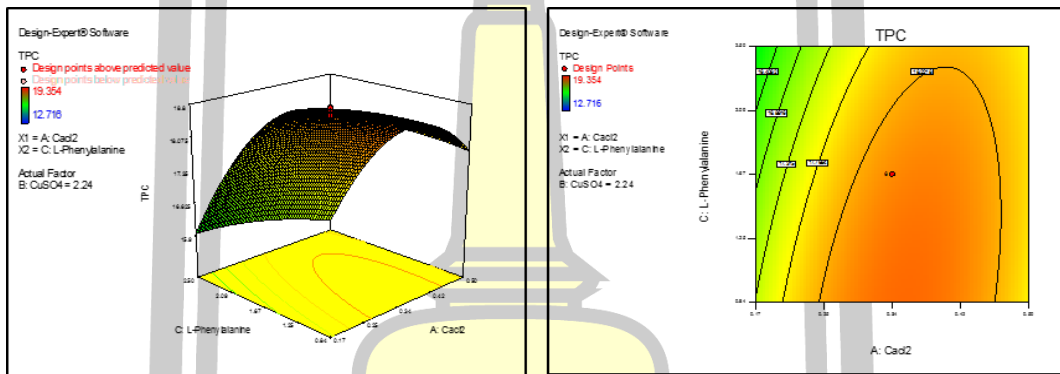


Figure 25 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงของ CaCl_2 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณพินอลิกทั้งหมด

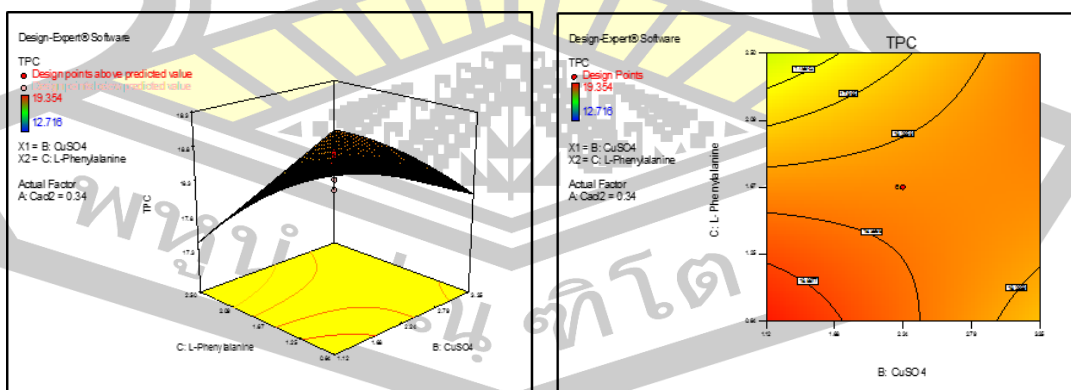


Figure 26 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanin ต่อปริมาณพินอลิกทั้งหมด

4.6.3 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ สารกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 27) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.25 – 0.50 g/L และ 1.12 – 1.3 mg/L ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 68.76 เปอร์เซ็นต์

อิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanine เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 28) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นโดยปริมาณสารจะสูงขึ้นเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณ CaCl_2 และ L-phenylalanine โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.17 – 0.25 g/L และ 0.84 – 1.25 mg/L ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารที่เติมในช่วงดังกล่าวจะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 68.71 เปอร์เซ็นต์

อิทธิพลร่วมของ L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ได้ผลดังแสดงใน (ภาพที่ 29) ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนองที่แสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงมีการเติม L-phenylalanine และ Cu_2SO_4 โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.84 – 2.09 mg/L และ 1.12 – 1.35 mg/L ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 68.9 เปอร์เซ็นต์

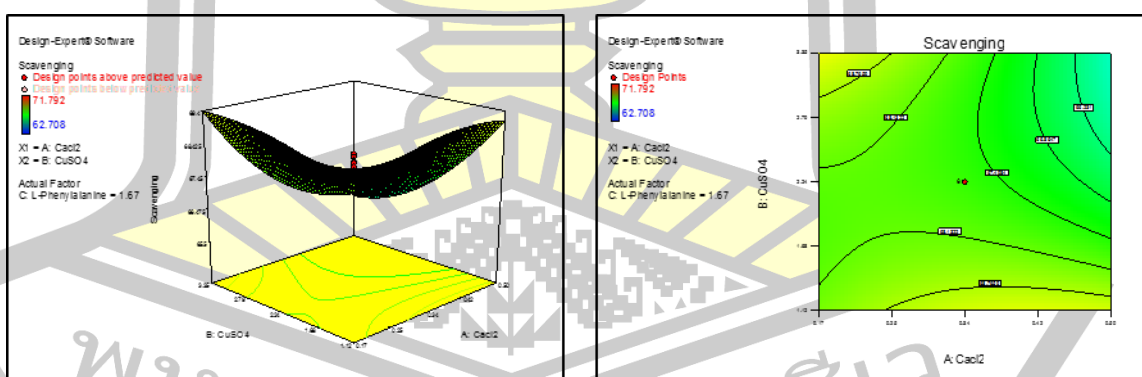


Figure 27 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ Cu_2SO_4 ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

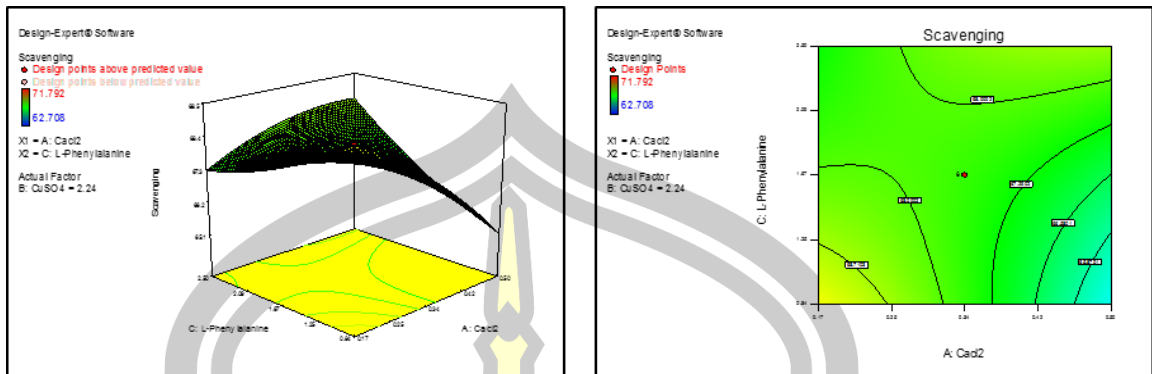


Figure 28 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ CaCl_2 และ L-phenylalanine ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

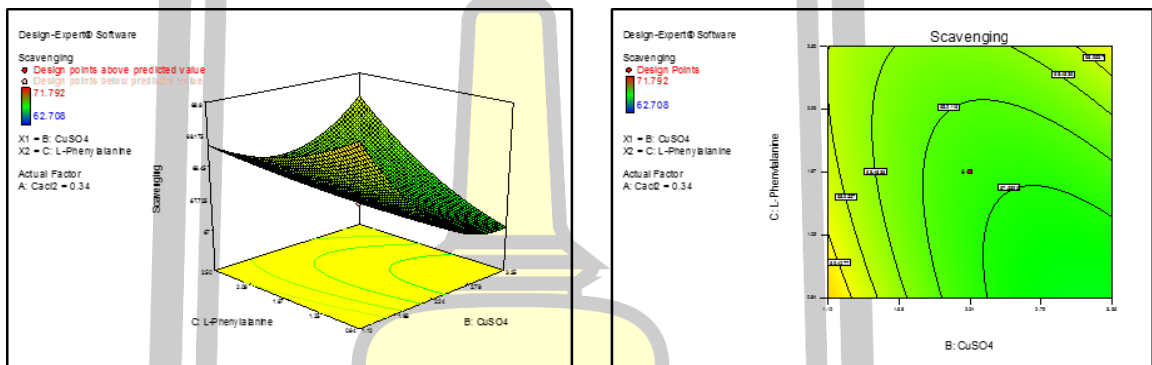
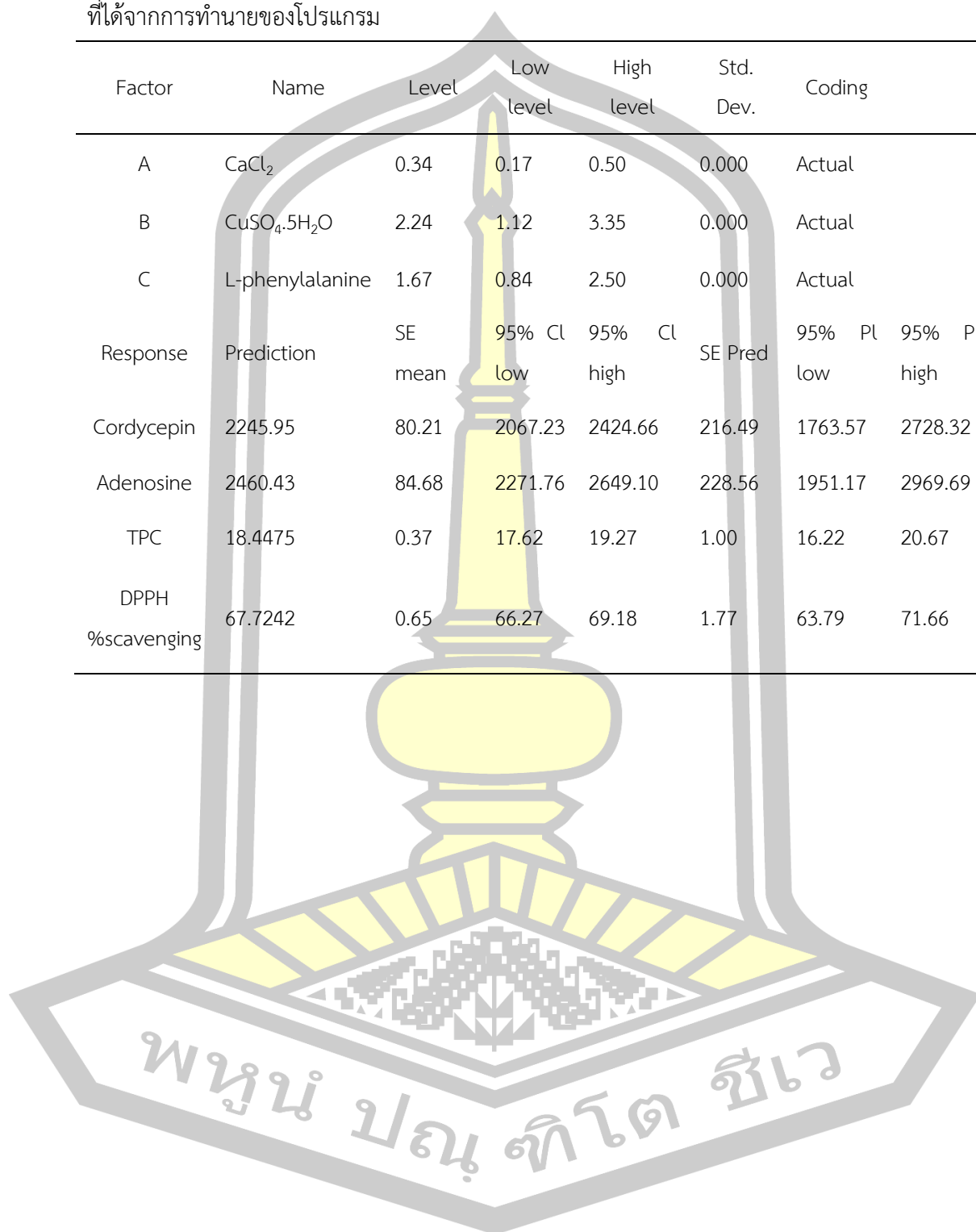


Figure 29 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (3D surface plot) และกราฟโครงร่าง (Contour plot) แสดงอิทธิพลร่วมของ Cu_2SO_4 และ L-phenylalanine ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ต่อปริมาณสารคอร์ติโคสเตอรอยด์ในพืช อะติโนซิน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ของการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าความเข้มข้นของ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine 0.34 g/L, 2.24 mg/L และ 1.67g/L (Table 29) โปรแกรมได้ทำนายว่าสภาวะดังกล่าวสามารถให้ปริมาณคอร์ติโคสเตอรอยด์ (2245.95 mg/kg) ปริมาณอะติโนซิน (2460.43 mg/kg) และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (18.4475 mg GAE/g dw) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH scavenging 67.7242 เปอร์เซ็นต์

Table 29 สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด
ที่ได้จากการทำนายของโปรแกรม

Factor	Name	Level	Low level	High level	Std. Dev.	Coding	
A	CaCl ₂	0.34	0.17	0.50	0.000	Actual	
B	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.24	1.12	3.35	0.000	Actual	
C	L-phenylalanine	1.67	0.84	2.50	0.000	Actual	
Response	Prediction	SE mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PL low	95% PL high
Cordycepin	2245.95	80.21	2067.23	2424.66	216.49	1763.57	2728.32
Adenosine	2460.43	84.68	2271.76	2649.10	228.56	1951.17	2969.69
TPC	18.4475	0.37	17.62	19.27	1.00	16.22	20.67
DPPH %scavenging	67.7242	0.65	66.27	69.18	1.77	63.79	71.66



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาและคัดกรองปัจจัยของสารกระตุ้นหรืออิลิซิเตอร์ (elicitor) ที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในการเพาะเลี้ยงถังเช่าสีทอง โดยการออกแบบการทดลองเพื่อคัดกรองปัจจัยโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett Burman Design จากสารกระตุ้นทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}), ZnSO_4 (Zn^{2+}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), Salicylic acid, Gibberellic acid, L-phenylalanine ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีสารกระตุ้น 3 ชนิด ได้แก่ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในการเพาะเลี้ยงถังเช่าสีทองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำปัจจัยที่ได้ทั้ง 3 ชนิดนี้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) จากการวิเคราะห์ผลสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ พบว่าความเข้มข้นของ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ที่ความเข้มข้น 0.34 g/L, 2.24 mg/L และ 1.67 mg/L เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงถังเช่าสีทองให้ได้ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ตามที่ต้องการ และได้สมการสำหรับทำนายการทดลองดังนี้

$$Y_{\text{ปริมาณคอร์ไดเซปิน}} = 2245.95 - 67.82X_1 - 100.01X_2 + 20.32X_3 - 150.13X_1X_2 + 287.23X_1X_3 + 173.98X_2X_3 - 117.43X_1^2 - 119.42X_2^2 + 103.52X_3^2 \text{ ----- (2)}$$

$$Y_{\text{อะดีโนซีน}} = 2460.43 - 23.54X_1 + 141.51X_2 + 79.75X_3 - 260.76X_1X_2 + 37.90X_1X_3 + 163.67X_2X_3 + 83.79X_1^2 + 126.09X_2^2 + 74.84X_3^2 \text{ -----(3)}$$

$$Y_{\text{ฟีนอลิกทั้งหมด}} = 18.45 + 0.57X_1 + 0.014X_2 - 0.35X_3 - 0.72X_1X_2 + 0.34X_1X_3 + 0.55X_2X_3 - 1.09X_1^2 - ((2.614 \times 10^3) - 0.04)X_2^2 - 0.14X_3^2 \text{ -----(4)}$$

$$Y_{\text{DPPH (\%scavenging)}} = 67.72 - 0.74X_1 - 0.61X_2 + 0.33X_3 - 1.16X_1X_2 + 1.39X_1X_3 + 0.80X_2X_3 - 0.41X_1^2 + 0.79X_2^2 + 0.31X_3^2 \text{ -----(5)}$$

โดยที่ X_1 , X_2 และ X_3 คือ CaCl_2 (Ca^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) และ L-phenylalanine ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายไปทำการทดลองเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ห้องอีกครั้งว่าได้ตามสมการทำนายหรือไม่ เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการออกแบบการทดลองโดยพิจารณาจากค่า Model ซึ่งต้องมีค่า p -value < 0.05 และ ค่า Lack of Fit ซึ่งต้องมีค่า p -value > 0.05



บรรณานุกรม

- ฉัญญา ทะพิงค์แก. 2555. การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ. กรุงเทพฯ: ฟูโพร่ พรินต์ติ้ง.
- ฉัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย, and วรรณพร ทะพิงค์แก. 2556. รายงานวิจัยเรื่อง ผลของวิธีการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง. เชียงใหม่.
- นวรรตน์ จันทร์กระเวน. 2548. การออกแบบการทดลองเพื่อปรับปรุงคุณภาพของแรงเหวี่ยงลูกบอลในกระบวนการเชื่อมวงจร: กรณีศึกษาโรงงานผลิตเคมีคอนดักเตอร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพโรจน์ วิริยจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. n.d. “องค์การมหาชน.” Retrieved June 27, 2016 (www.arda.or.th.).
- อนุวัตร แจ้งชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิษฐา ทองทับ, and วรรณพร ทะพิงค์แก. 2557. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดผสมไมโครถั่งเช่าสีทองและการนำไปใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ.
- อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2544. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Aijaz, A., S. Jain, and A. Hariharan. 2011. “Effect of Elicitation on the Production of Phyto- Constituents through Plant Tissue Culture Technique a Review.” *Drug Discov Herb Res* 1(2):84–90.
- Alabadi, D., J. Gallego-Bartolomé, L. Orlando, L. García-Cárcel, V. Rubio, C. Martínez, and M. A. Blázquez. 2008. “Gibberellins Modulate Light Signaling Pathways to Prevent Arabidopsis Seedling De-Etiolation in Darkness.” *Plant Journal* 53(2):324–35.
- Angelova, Z., S. Georgiev, and W. Roos. 2006. “Elicitation of Plants.” *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 20(2):72–83.
- Bakar, M. F. A., M. Mohamed, A. Rahmat, and J. Fry. 2009. “Phytochemicals and Antioxidant Activity of Different Parts of Bambang (Mangifera Pajang) and Tarap (Artocarpus Odoratissimus).” *Food Chemistry* 113(2):479–83.
- Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP Assay.” *Analytical Biochemistry*

239(1):70–76.

Chen, Y., Y. C. Chen, Y. T. Lin, S. H. Huang, and S. M. Wang. 2010. “Cordycepin Induces Apoptosis of CGTH W-2 Thyroid Carcinoma Cells through the Calcium-Calpain-Caspase 7-PARP Pathway.” *J Agric Food Chem.* 58(22):11645–52.

Choi, S., M. H. Lin, K. M. Kim, B. H. Jeon, W. O. Song, and T. W. Kim. 2011. “Cordycepin-Induced Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells Are Independent of the Estrogen Receptor.” *Toxicol Appl Pharmacol.* 257(2):165–73.

Cunningham, K., W. Manson, F. Spring, and S. Hutchinson. 1950. “Cordycepin, a Metabolic Product Isolated from Cultures of *Cordyceps Militaris* (Linn.) Link.” *Nature* 166:949.

Das, S. K., M. Masuda, A. Sakurai, and M. Sakakibara. 2010. “Medicinal Uses of the Mushroom *Cordyceps Militaris*: Current State and Prospects.” *Fitoterapia* 81(8):961–68.

Debeaujon, I., and M. Koornneef. 2000. “Gibberellin Requirement for Arabidopsis Seed Germination Is Determined Both by Testa Characteristics and Embryonic Abscisic Acid.” *Plant Physiology* 122(2):415–24.

Dong, C. H., X. Q. Xie, X. L. Wang, Y. Zhan, and Y. J. Yao. 2009. “Application of Box-Behnken Design in Optimisation for Polysaccharides Extraction from Cultured Mycelium of *Cordyceps Sinensis*.” *Food and Bioproducts Processing* 87(2):139–44.

Fan, D., W. Wang, and J. Z. Jiang. 2012. “Enhancement of Cordycepin Production in Submerged Cultures of *Cordyceps Militaris* by Addition of Ferrous Sulfate.” *Biochemical Engineering Journal* 60:30–35.

GAO, Y. M., and G. P. LIU. 2010. “Progress in *Cordyceps Sinensis* in Protection of Kidney [J].” *Medical Recapitulate* 2.

Griffiths, J., K. Murase, I. Rieu, R. Zentella, Z. L. Zhang, S. J. Powers, and S. G. Thomas. 2006. “Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis.” *Plant Cell* 18(12):3399–3414.

Gu, Y. X., Z. S. Wang, S. X. Li, and Q. S. Yuan. 2007. “Effect of Multiple Factors on Accumulation of Nucleosides and Bases in *Cordyceps Militaris*.” *Food Chemistry* 102(4):1304–9.

Guan, W., J. Zhang, R. Yan, S. Shao, T. Zhou, J. Lei, and Z. Wang. 2016. “Effects of UV-C

- Treatment and Cold Storage on Ergosterol and Vitamin D2 Contents in Different Parts of White and Brown Mushroom (*Agaricus Bisporus*)." *Food Chemistry* 210:129–34.
- Hashimoto, K., and B. Simizu. 1976a. "Effect of Cordycepin on the Replication of Western Equine Encephalitis Virus." *Archives of Virology* 52(4):341–45.
- Hashimoto, K., and B. Simizu. 1976b. "Effect of Cordycepin on the Replication of Western Equine Encephalitis Virus." *Archives of Virology* 52(4):341–45.
- Huang, Y., J. Lu, B. Zhu, Q. Wen, F. Jia, S. Zeng, and Z. Yi. 1987. "Toxicity Study of Fermentation Cordyceps Mycelia B414." *Zhongchengyao Yanjiu* 10:24–25.
- Hung, Y. P., J. J. Wang, B. L. Wei, and C. L. Le. 2015. "Effect of the Salts of Deep Ocean Water on the Production of Cordycepin and Adenosine of Cordyceps Militaris-Fermented Product." *AMB Express* 5:53.
- Kim, S. W., H. J. Hwang, C. P. Xu, J. M. Sung, J. W. Choi, and J. W. Yun. 2003. "Optimization of Submerged Culture Process for the Production of Mycelial Biomass and Exo-Polysaccharides by Cordyceps Militaris C738." *Journal of Applied Microbiology* 94(1):120–26.
- Kuete, Victor, Igor K. Voukeng, Roger Tsobou, Armelle T. Mbaveng, Benjamin Wiench, Veronique P. Beng, and Thomas Efferth. 2013. "Cytotoxicity of Elaeophorbia Drupifera and Other Cameroonian Medicinal Plants against Drug Sensitive and Multidrug Resistant Cancer Cells." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(1):1. doi: 10.1186/1472-6882-13-250.
- Lee, Y. R., E. M. Noh, E. Y. Jeong, S. K. Yun, Y. J. Jeong, J. H. Kim, K. B. Kwon, B. S. Kim, S. H. Lee, C. S. Park, and J. S. Kim. 2009. "Cordycepin Inhibits UVB-Induced Matrix Metalloproteinase Expression by Suppressing the NF- κ B Pathway in Human Dermal Fibroblast." *Exp Mol Med*. 41(8):548–54.
- Li, C. Y., C. S. Chiang, M. L. Tsai, R. S. Hseu, W. Y. Shu, C. Y. Chuang, Y. C. Sun, Y. S. Chang, J. G. Lin, C. S. Chen, C. L. Huang, and I. C. Hsu. 2009. "Two-Sided Effect of Cordyceps Sinensis on Dendritic Cells in Different Physiological Stages." *J Leukoc Biol*. 85(6):987–95.
- Lu, Y., J. Zhang, X. Wang, Q. Lin, W. Liu, X. Xie, Z. Wang, and W. Guan. 2016. "Effects of UV-C Irradiation on the Physiological and Antioxidant Responses of Button

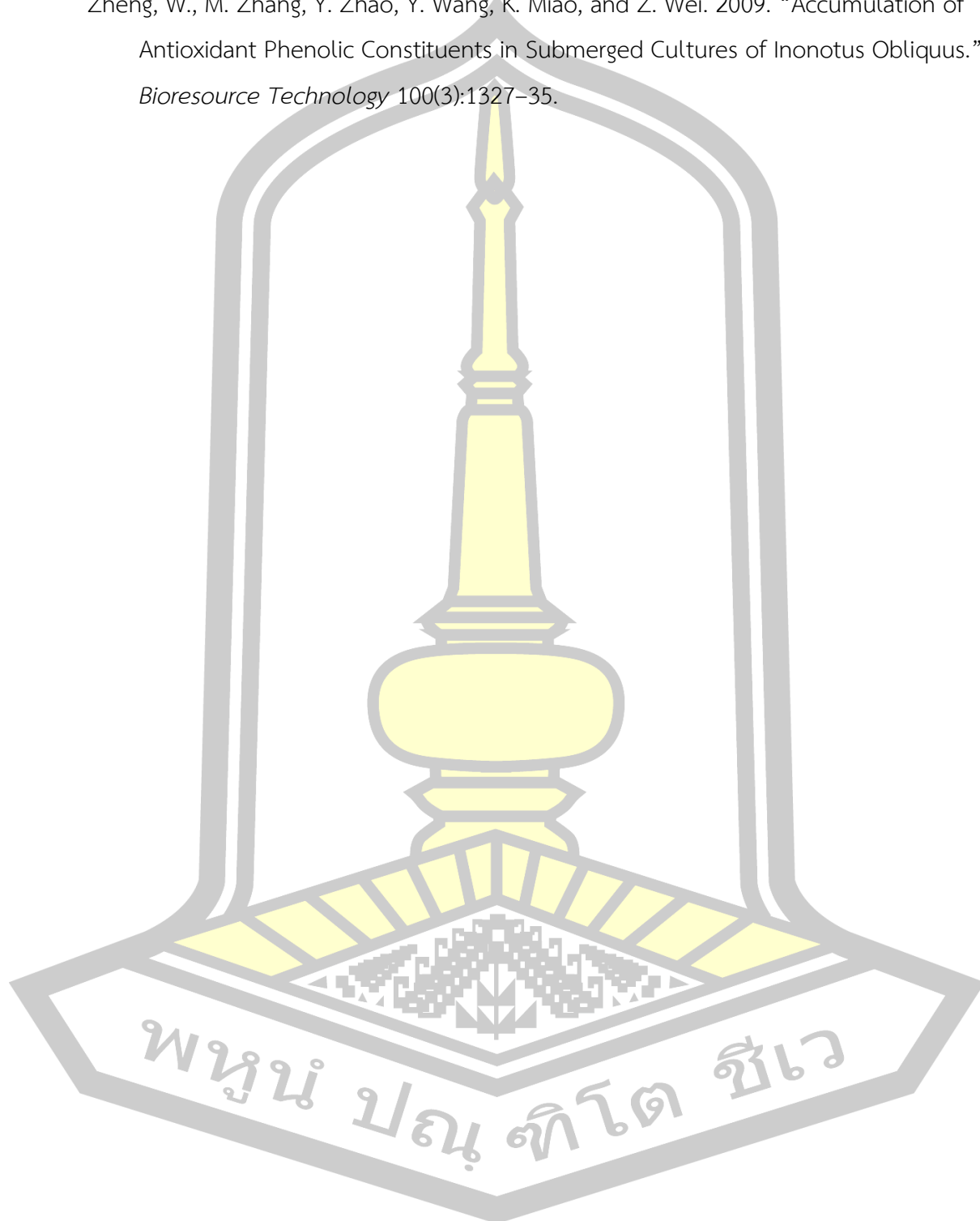
- Mushrooms (*Agaricus Bisporus*) during Storage.” *International Journal of Food Science & Technology* 51(6):1502–8.
- Ma, Y., P. Wang, T. Zhou, Z. Chen, Z. Gu, and R. Yang. 2019. “Role of Ca²⁺ in Phenolic Compound Metabolism of Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Sprouts under NaCl Stress.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(11):5176–86.
- Mendoza, D., O. Cuaspu, J. P. Arias, O. Ruiz, and M. Arias. 2018. “Effect of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate in the Production of Phenolic Compounds in Plant Cell Suspension Cultures of *Thevetia Peruviana*.” *Biotechnology Reports* 19(63):1–9.
- Menke, F. L., S. Parchmann, M. J. Mueller, J. W. Kijne, and J. Memelink. 1999. “Involvement of the Octadecanoid Pathway and Protein Phosphorylation in Fungal Elicitor-Induced Expression of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthetic Genes in *Catharanthus Roseus*.” *Plant Physiology* 119(4):1289–96.
- Naik, P. M., and J. M. Al-Khayri. 2016. “Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants.” Pp. 247–77 in *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. INTECH.
- Nair, V. D., R. Panneerselvam, R. Gopi, and S. Hong-bo. 2013. “Elicitation of Pharmacologically Active Phenolic Compounds from *Rauvolfia Serpentina* Benth. Ex. Kurtz.” *Industrial Crops and Products* 45:406–15.
- Patel, H., and R. Krishnamurthy. 2013. “Elicitors in Plant Tissue Culture.” *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2(2):60–65.
- Paterson, R. R. M. 2008. “Cordyceps–A Traditional Chinese Medicine and Another Fungal Therapeutic Biofactory.” *Phytochemistry* 69(7):1469–95.
- Plackett, R. L., and J. P. Burman. 1946. “The Design of Optimum Multifactorial Experiments.” *Biometrika* 33(4):305–25.
- Rahmani Samani, M., A. Ghasemi Pirbalouti, F. Moattar, and A. R. Golparvar. 2019. “L-Phenylalanine and Bio-Fertilizers Interaction Effects on Growth, Yield and Chemical Compositions and Content of Essential Oil from the Sage (*Salvia Officinalis* L.) Leaves.” *Industrial Crops and Products* 137:1–8.
- Ramesh, T., S. K. Yoo, S. W. Kim, S. Y. Hwang, S. H. Sohn, I. W. Kim, and S. K. Kim. 2012. “Cordycepin (3'-Deoxyadenosine) Attenuates Age-Related Oxidative Stress and

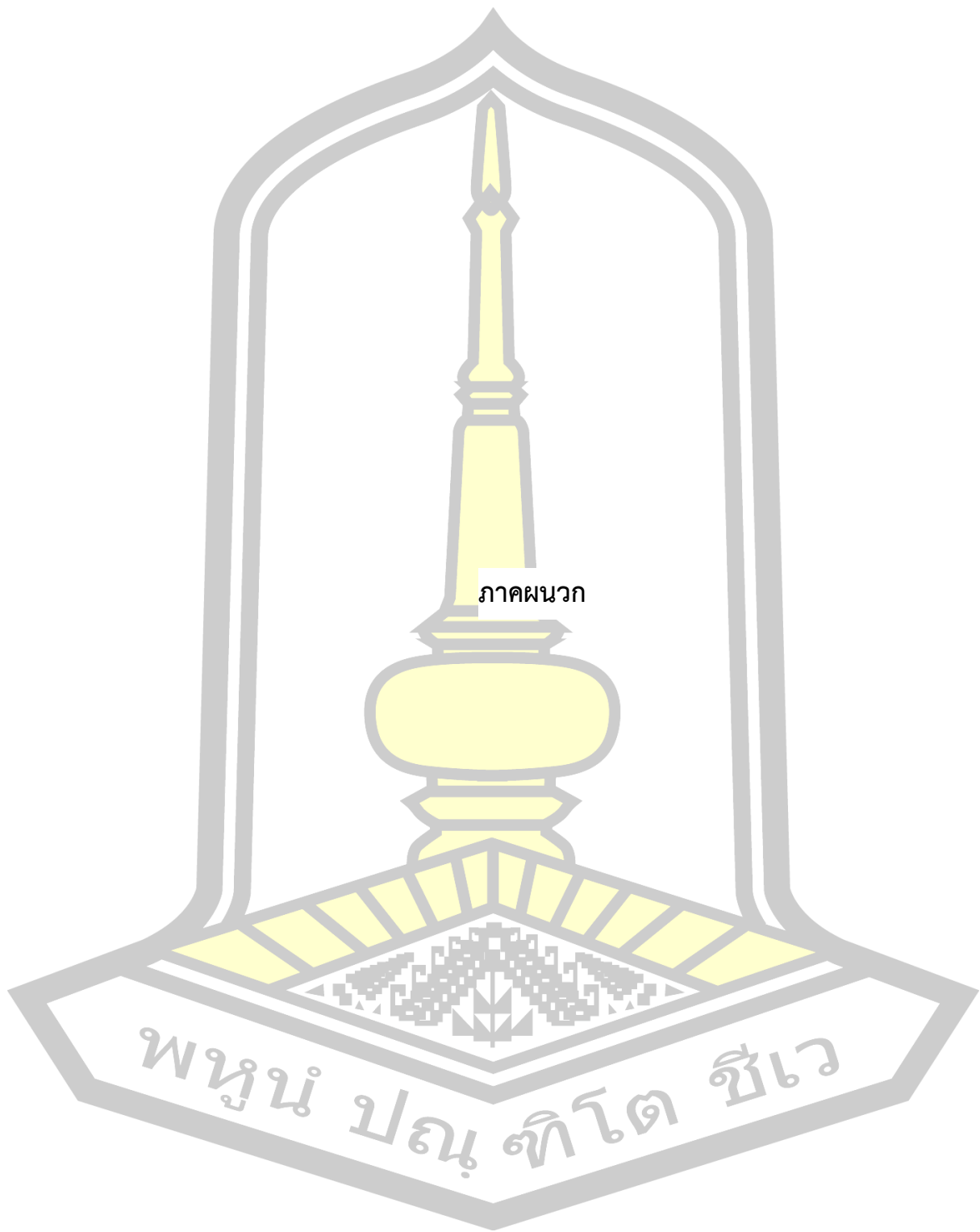
- Ameliorates Antioxidant Capacity in Rats.” *Experimental Gerontology* 47(12):979–87.
- Ryoo, R., H. D. Sou, K. H. Ka, and H. Park. 2018. “Elicitor-Induced β -Glucan Contents in Fruit Body of Cauliflower Mushroom (*Sparassis Latifolia*).” *Forest Science and Technology* 14(3):1–7.
- Shrestha, B., W. Zhang, Y. Zhang, and X. Liu. 2012. “The Medicinal Fungus *Cordyceps Militaris*: Research and Development.” *Mycological Progress* 11(3):599–614.
- De Silva, D. D., S. Rapior, E. Sudarman, M. Stadler, J. Xu, S. A. Alias, and K. D. Hyde. 2013. “Bioactive Metabolites from Macrofungi: Ethnopharmacology, Biological Activities and Chemistry.” *Fungal Diversity* 62(1):1–40.
- Singleton, V. L., and J. A. Rossi. 1965. “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents.” *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144–58.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., J. Słota, and J. Pietraszek. 2014. “The Influence of L-Phenylalanine, Methyl Jasmonate and Sucrose Concentration on the Accumulation of Phenolic Acids in *Exacum affine* Balf. f. *Ex Regel* Shoot Culture.” *Acta Biochimica Polonica* 61(1):47–53.
- Smith, J. E., N. J. Rowan, and R. Sullivan. 2002. “Medicinal Mushrooms: A Rapidly Developing Area of Biotechnology for Cancer Therapy and Other Bioactivities.” *Ostechnology Letters* 24(22):1839–45.
- Stair, Ralph M. 1996. *Principles of Information : A Managerial Approach*. Massachusetts: Boyd & Fraser.
- Sudheer, S., W. K. Yeoh, S. Manickam, and A. Ali. 2016. “Effect of Ozone Gas as an Elicitor to Enhance the Bioactive Compounds in *Ganoderma Lucidum*.” *Postharvest Biology and Technology* 117:81–88.
- Thomadaki, H., A. Scorilas, C. M. Tsiapalis, and M. Havredaki. 2008. “The Role of Cordycepin in Cancer Treatment via Induction or Inhibition of Apoptosis: Implication of Polyadenylation in a Cell Type Specific Manner.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61(2):251–65.
- Tian, C., Y. Chang, Z. Zhang, H. Wang, S. Xiao, C. Cui, and M. Liu. 2019. “Extraction

- Technology, Component Analysis, Antioxidant, Antibacterial, Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Flavonoids Fraction from Tribulus Terrestris L. Leaves.” *Heliyon* 5:1–11.
- Tumova, L., K. Gallová, and J. Rimáková. 2004. “Silybum Marianum in Vitro.” *Ceská a Slovenská Farmacie : Casopis České Farmaceutické Společnosti a Slovenské Farmaceutické Společnosti* 53:135–40.
- Wasser, S. P., and A. L. Weis. 1999. “Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives.” *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1(1):31–62.
- White, C. N., and C. J. Rivin. 2000. “Gibberellins and Seed Development in Maize. II. Gibberellin Synthesis Inhibition Enhances Abscisic Acid Signaling in Cultured Embryos.” *Plant Physiology* 122(4):1089–97.
- William, D., W. Montgomery, and G. Runger. 1999. *Applied Statistics and Probability for Engineers*. Fairfield: United States of America: Quebecor Printing.
- Xu, X., X. Zhang, and C. Chen. 2016. “Stimulated Production of Triterpenoids of Inonotus Obliquus Using Methyl Jasmonate and Fatty Acids.” *Industrial Crops and Products* 85:49–57.
- Ye, L., S. Liu, F. Xie, L. Zhao, and X. Wu. 2018. “Enhanced Production of Polysaccharides and Triterpenoids in Ganoderma Lucidum Fruit Bodies on Induction with Signal Transduction during the Fruiting Stage.” *PloS One* 13(4):1–15.
- Yoshikawa, N., S. Yamada, C. Takeuchi, S. Kagota, K. Shinozuka, M. Kunitomo, and K. Nakamura. 2008. “Cordycepin (3'-Deoxyadenosine) Inhibits the Growth of B16-BL6 Mouse Melanoma Cells through the Stimulation of Adenosine A₃ Receptor Followed by Glycogen Synthase Kinase-3 β Activation and Cyclin D 1 Suppression.” *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377(4–6):591–95.
- Zhang, J., J. J. Zhong, and A. Geng. 2014. “Improvement of Ganoderic Acid Production by Fermentation of Ganoderma Lucidum with Cellulase as an Elicitor.” *Process Biochemistry* 49(10):1580–86.
- Zhao, J., L. C. Davis, and R. Verpoorte. 2005. “Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites.” *Biotechnology Advances* 23(4):283–

333.

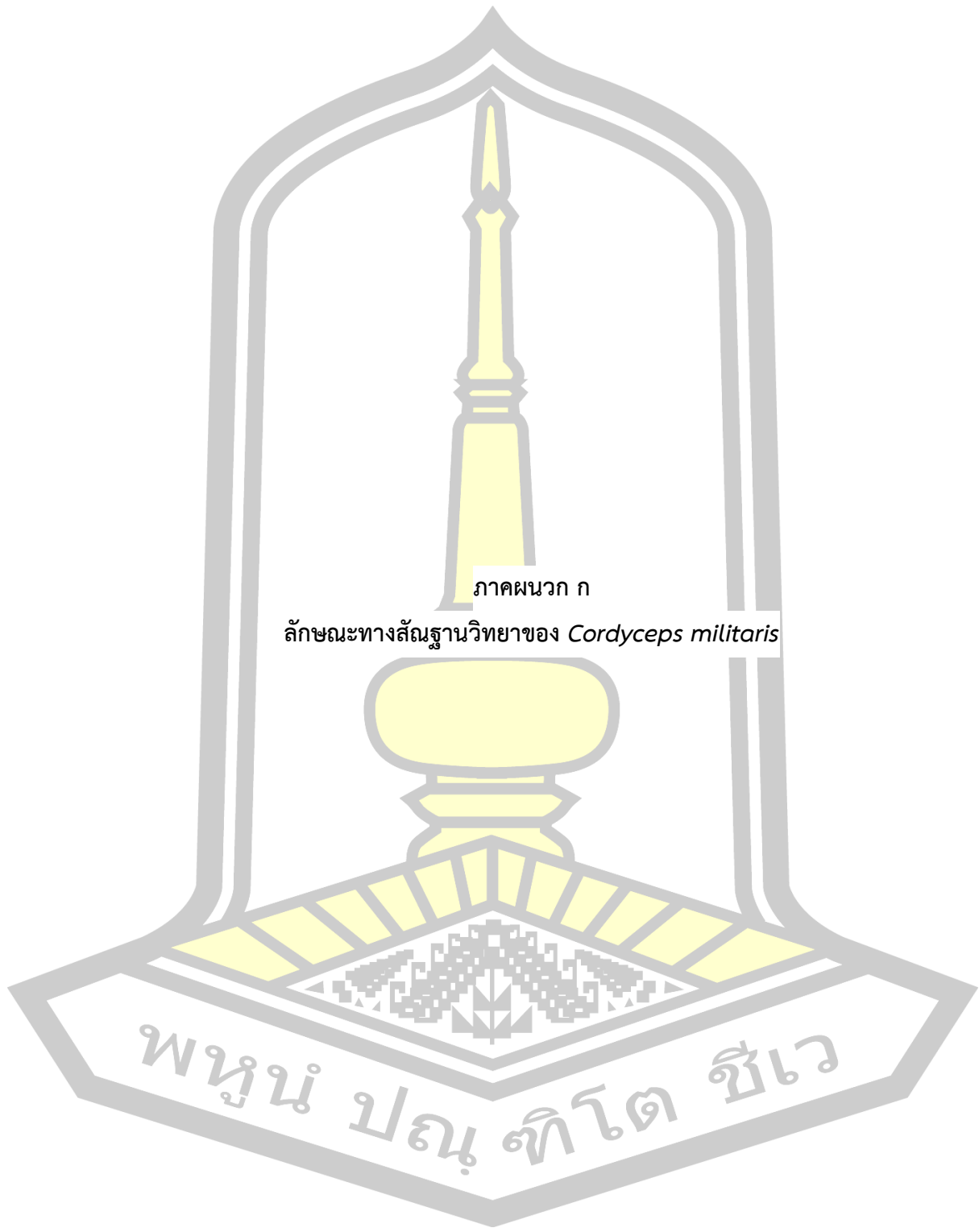
Zheng, W., M. Zhang, Y. Zhao, Y. Wang, K. Miao, and Z. Wei. 2009. "Accumulation of Antioxidant Phenolic Constituents in Submerged Cultures of *Inonotus Obliquus*." *Bioresource Technology* 100(3):1327–35.





ภาคผนวก

พหุมนุ ปณุ ทิโต ชีเว



ภาคผนวก ก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Cordyceps militaris*

พหุ ประทีป วิทยา



Figure 30 ลักษณะดอกและความยาวของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองเจริญเต็มวัย

พหุ ประถมศึกษา



ภาคผนวก ข

โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน

โดยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid
Chromatography)

พหุณฺ์ ปณฺุ ทิโต สีเว

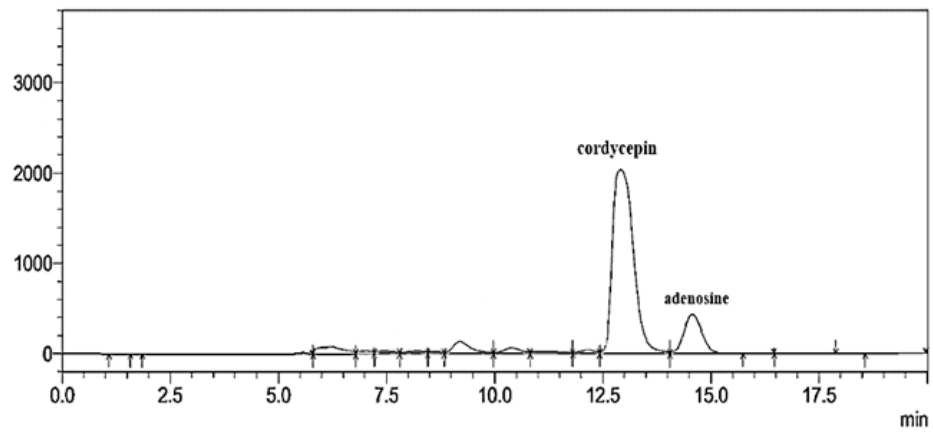


Figure 31 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine)

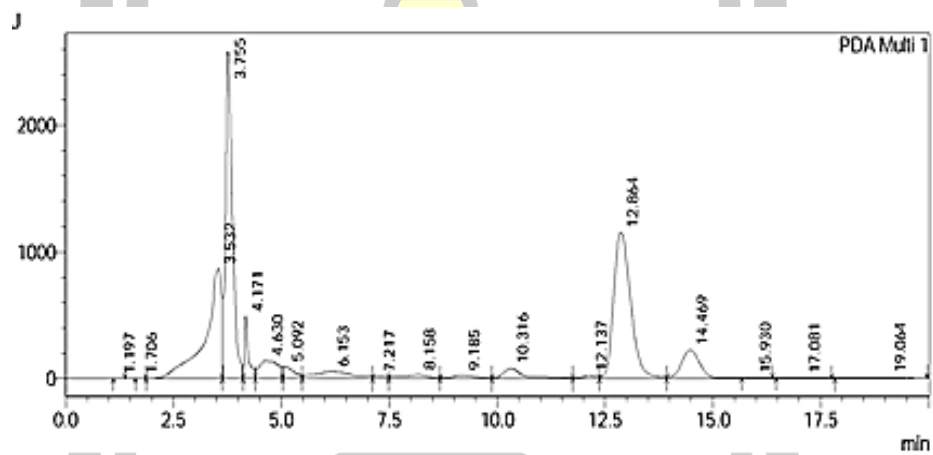


Figure 32 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากกราววิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองรันที่ 1



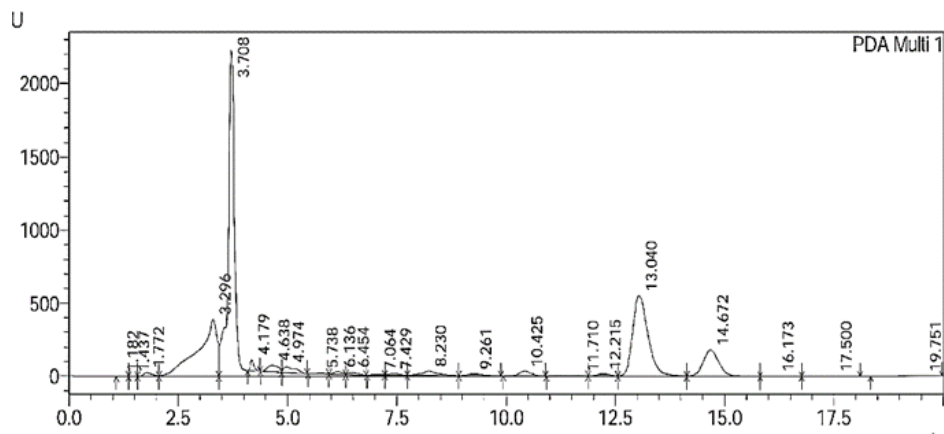


Figure 33 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 2

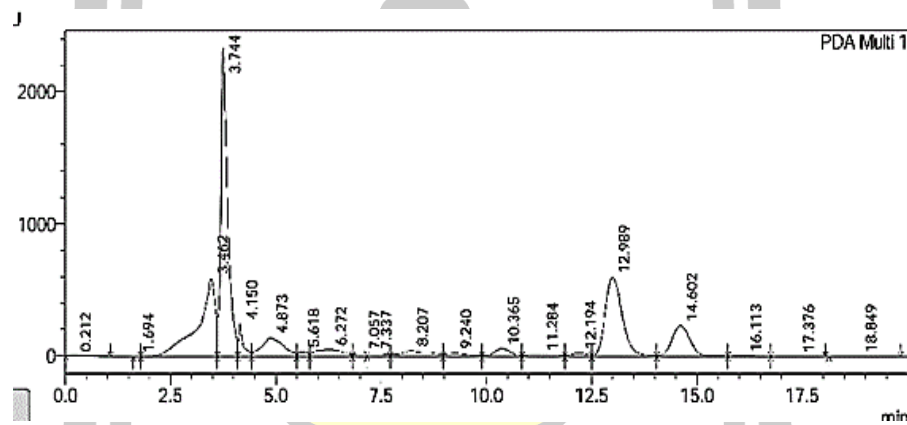


Figure 34 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 3

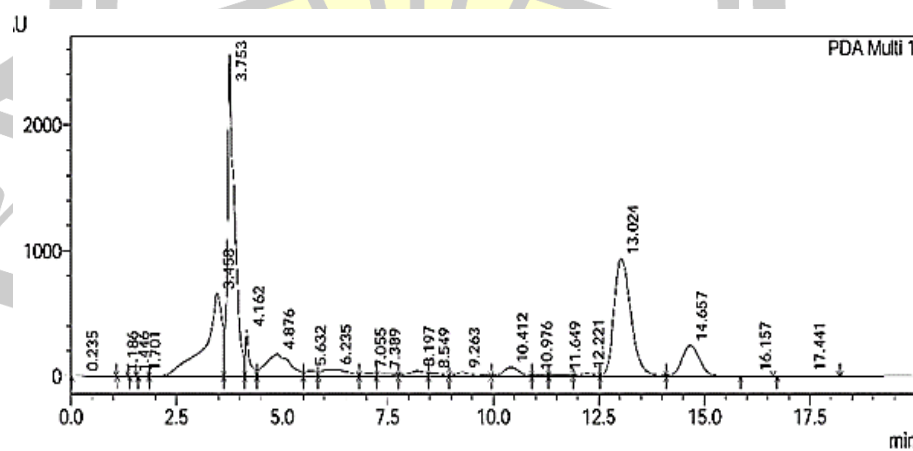


Figure 35 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 4

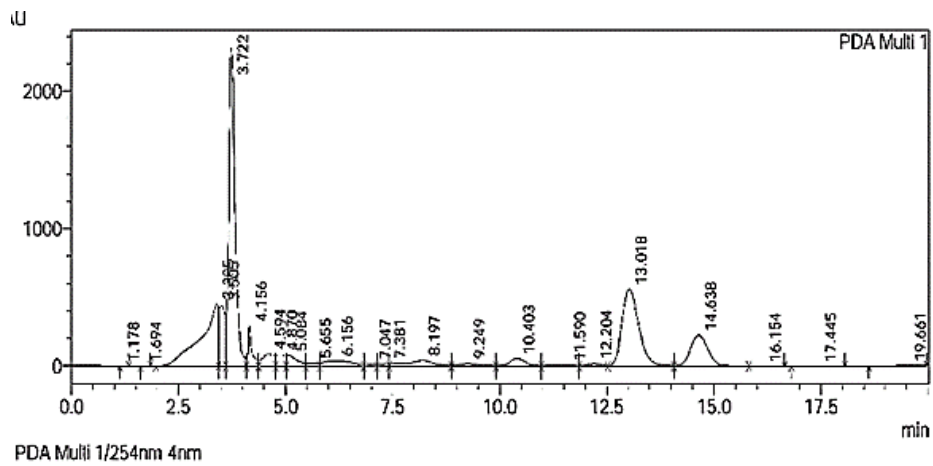


Figure 36 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 5

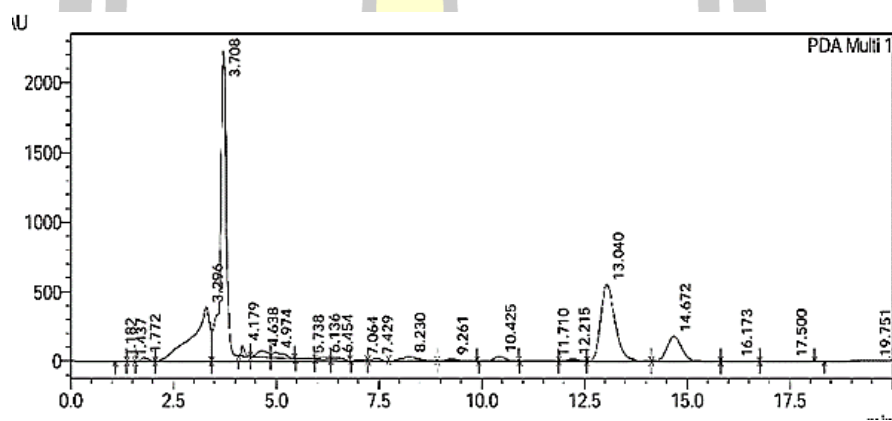


Figure 37 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 6

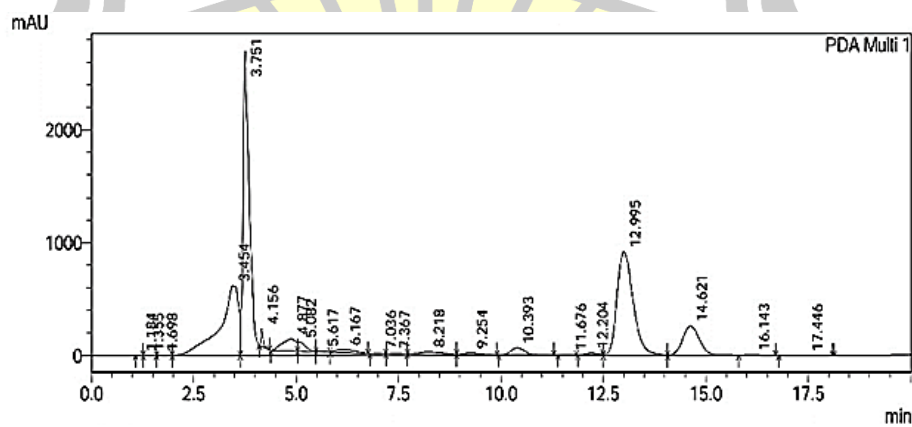


Figure 38 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองครั้งที่ 7

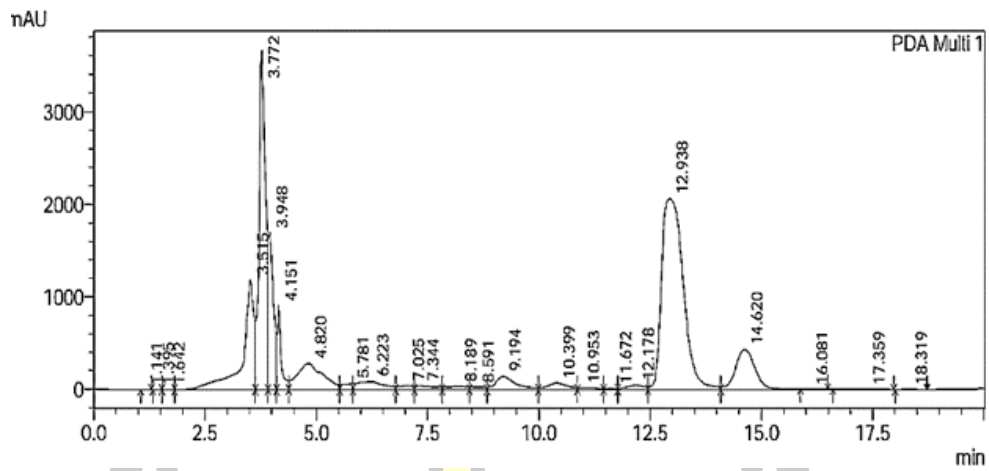


Figure 39 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 8

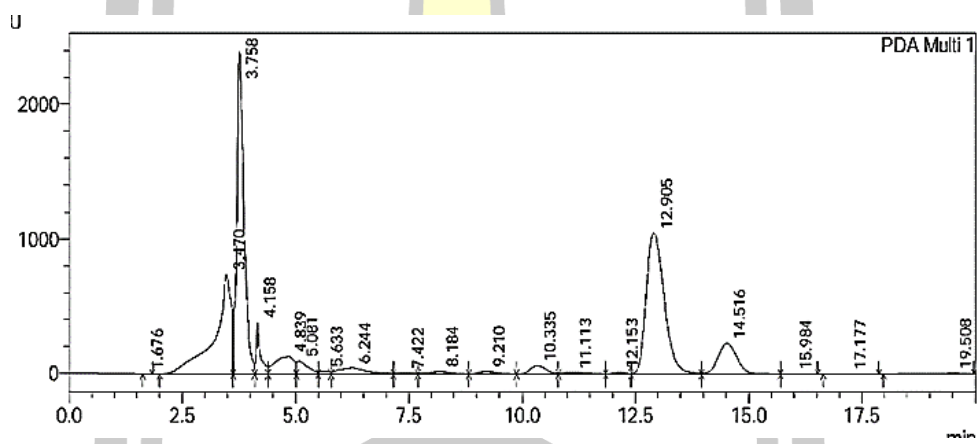


Figure 40 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 9

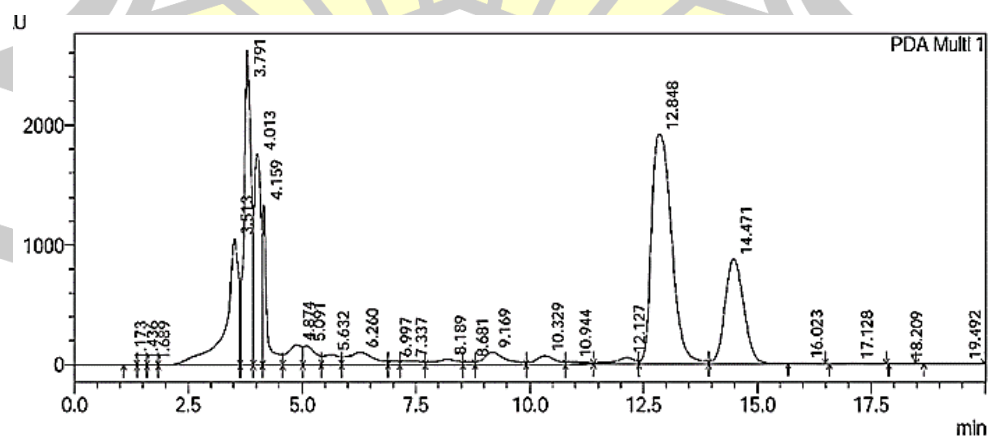


Figure 41 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 10

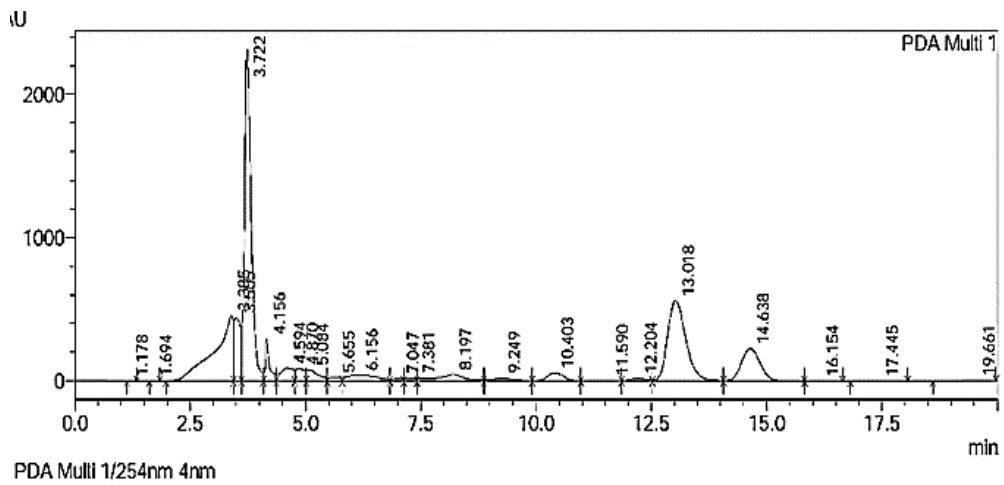


Figure 42 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 11

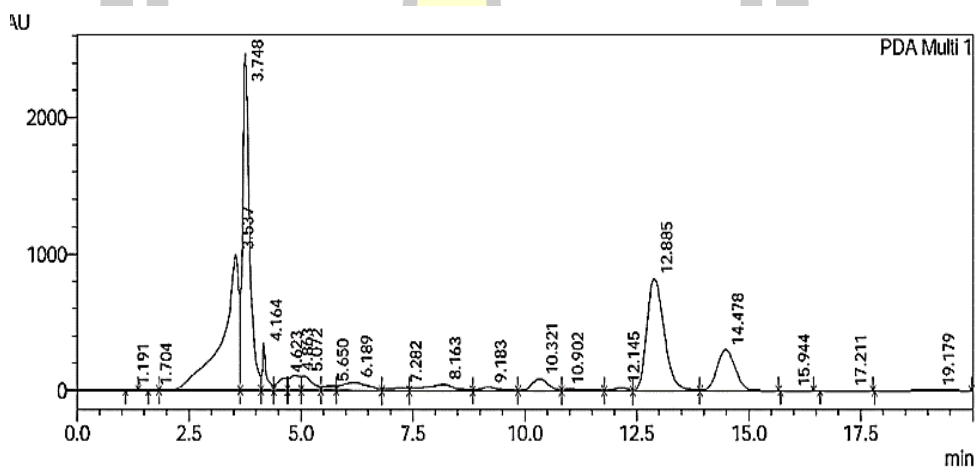
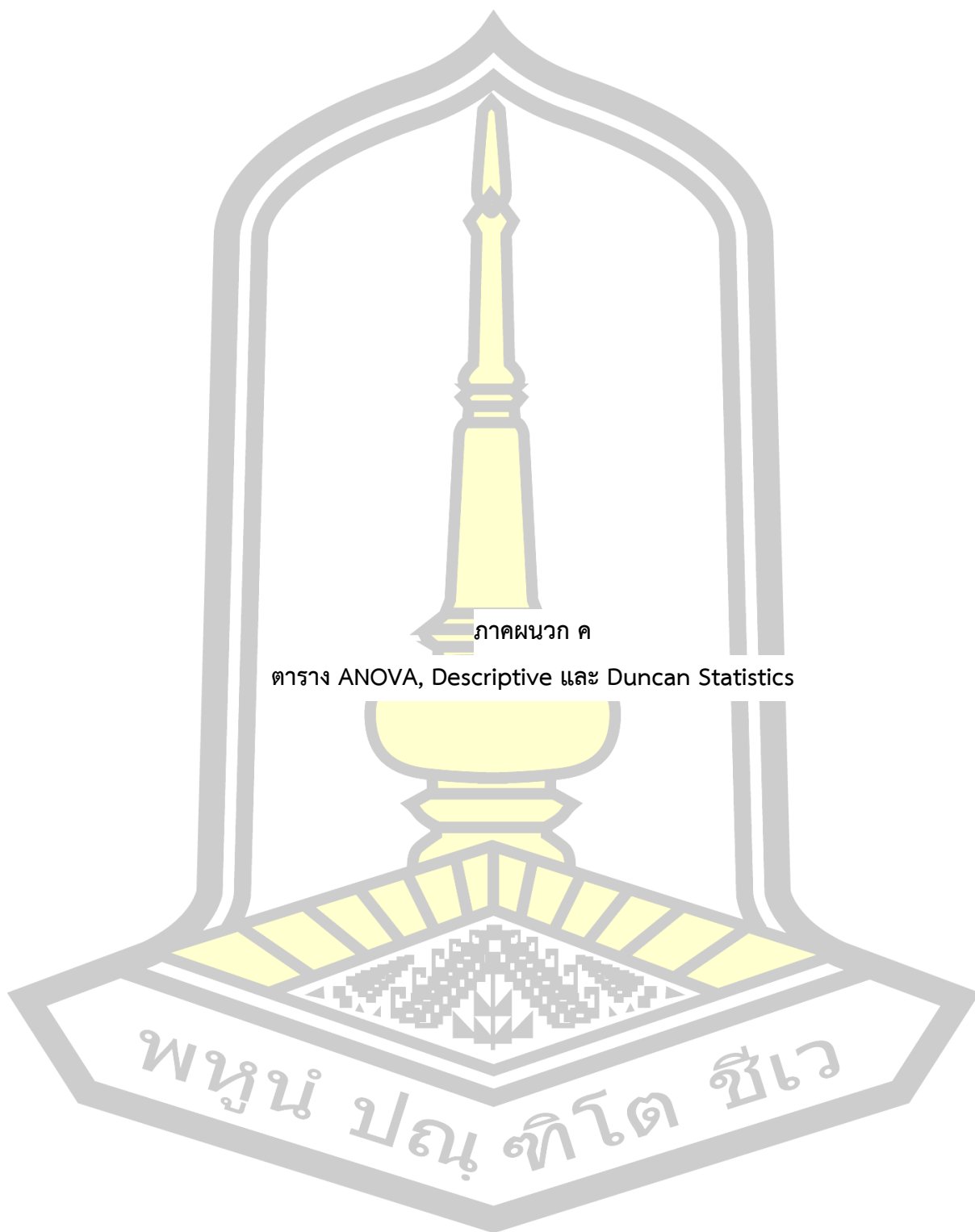


Figure 43 โครมาโตแกรมของสารคอร์ไดเซปิน (cordycepin) และสารอะดีโนซีน (adenosine) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC การทดลองวันที่ 12





ภาคผนวก ค

ตาราง ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics

พหุบัน ปณฺ ทิโต ชีเว

Table 27 Descriptive ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน สารอะดีโนซีน การเจริญ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Descriptives			
Treatment 1	3	4115.2535	2.24778	1.29776	4109.6697	4120.8373	4112.66	4116.55
Treatment 2	3	4712.5467	7.23303	4.17599	4694.5789	4730.5146	4708.37	4720.90
Treatment 3	3	2350.5594	3.85386	2.22503	2340.9859	2360.1329	2346.11	2352.78
Treatment 4	3	3751.8245	1.76770	1.02058	3747.4333	3756.2158	3749.78	3752.85
Treatment 5	3	2127.0441	17.76897	10.25892	2082.9035	2171.1846	2116.79	2147.56
Treatment 1	3	1846.9852	10.58555	6.11157	1820.6892	1873.2812	1840.87	1859.21
Treatment 1	3	3605.8381	1.57051	.90673	3601.9367	3609.7395	3604.93	3607.65
Treatment 8	3	10105.8869	119.47157	68.97694	9809.1031	10402.6707	9967.93	10174.86
Treatment 9	3	4185.4169	24.10062	13.91450	4125.5476	4245.2862	4171.50	4213.25
Treatment 10	3	8587.7591	4.06536	2.34714	8577.6602	8597.8581	8585.41	8592.45
Treatment 11	3	5403.5711	29.88013	17.25130	5329.3448	5477.7975	5369.07	5420.82
Treatment 12	3	3141.0444	1.48507	.85740	3137.3553	3144.7335	3139.33	3141.90
control	3	4553.2350	11.15545	6.44060	4525.5233	4580.9467	4540.35	4559.68
Total	39	4498.9973	2346.67163	375.76820	3738.2944	5259.7003	1840.87	10174.86
Treatment 1	3	1375.9947	212.60383	122.74688	847.8576	1904.1319	1130.50	1498.74
Treatment 2	3	2419.0075	28.92939	16.70239	2347.1429	2490.8720	2402.31	2452.41
Treatment 3	3	976.3119	40.07365	23.13653	876.7634	1075.8603	930.04	999.45
Treatment 4	3	1146.7155	7.94891	4.58931	1126.9694	1166.4617	1142.13	1155.89
Treatment 5	3	759.2067	89.74475	51.81416	536.2683	982.1450	707.39	862.83

Treatment 12	3	10.9840	.30157	.17411	10.2349	11.7331	10.64	11.19
control	3	11.1720	.24557	.14178	10.5620	11.7820	10.98	11.45
Total	39	10.8856	2.29029	.36674	10.1432	11.6281	5.76	14.68
Treatment 1	3	.8740	.08000	.04619	.6753	1.0727	.79	.95
Treatment 2	3	1.1173	.11590	.06692	.8294	1.4053	.99	1.22
Treatment 3	3	.8773	.03055	.01764	.8014	.9532	.84	.90
Treatment 4	3	.4773	.01155	.00667	.4486	.5060	.46	.48
Treatment 5	3	.7340	.06245	.03606	.5789	.8891	.68	.80
Treatment 1	3	.3973	.05686	.03283	.2561	.5386	.33	.44
Treatment 1	3	.8940	.05000	.02887	.7698	1.0182	.84	.94
Treatment 8	3	.7940	.07211	.04163	.6149	.9731	.73	.87
Treatment 9	3	.7573	.05508	.03180	.6205	.8941	.70	.81
Treatment 10	3	1.0607	.10214	.05897	.8069	1.3144	.94	1.13
Treatment 11	3	1.3607	.20207	.11667	.8587	1.8626	1.14	1.54
Treatment 12	3	4.3707	.34152	.19717	3.5223	5.2190	4.07	4.74
control	3	1.3573	.24338	.14051	.7527	1.9619	1.09	1.57
Total	39	1.1594	.98679	.15801	.8395	1.4793	.33	4.74
Treatment 1	3	22.6430	1.75150	1.01123	18.2920	26.9940	20.89	24.39
Treatment 2	3	25.3567	1.74620	1.00817	21.0189	29.6945	23.90	27.29
Treatment 3	3	25.9247	4.57551	2.64167	14.5585	37.2909	20.90	29.85
Treatment 4	3	22.2923	2.28799	1.32097	16.6086	27.9760	20.63	24.90
Treatment 5	3	25.9537	5.77820	3.33605	11.5998	40.3075	19.81	31.27
Treatment 1	3	23.0200	4.21797	2.43525	12.5420	33.4980	18.27	26.31
Treatment 1	3	23.0417	4.06395	2.34632	12.9463	33.1371	19.68	27.56
Fresh weight								

TFC

Treatment 8	3	6.0690	.97007	.56007	3.6592	8.4788	4.96	6.76
Treatment 9	3	20.0967	5.42431	3.13172	6.6219	33.5714	13.87	23.80
Treatment 10	3	22.1637	1.57291	.90812	18.2563	26.0710	20.36	23.24
Treatment 11	3	21.6667	1.99857	1.15387	16.7020	26.6314	20.30	23.96
Treatment 12	3	22.4123	1.73267	1.00036	18.1081	26.7165	20.47	23.80
control	3	19.4867	1.50087	.86653	15.7583	23.2150	17.75	20.39
Total	39	21.5482	5.62674	.90100	19.7243	23.3722	4.96	31.27
Treatment 1	3	4.2030	.12088	.06979	3.9027	4.5033	4.08	4.32
Treatment 2	3	4.2370	.45394	.26208	3.1094	5.3646	3.72	4.58
Treatment 3	3	4.0207	.24442	.14112	3.4135	4.6278	3.84	4.30
Treatment 4	3	4.2027	.50031	.28885	2.9598	5.4455	3.63	4.52
Treatment 5	3	4.4843	.54516	.31475	3.1301	5.8386	4.08	5.11
Treatment 1	3	4.0943	.17763	.10255	3.6531	4.5356	3.90	4.25
Treatment 1	3	4.6700	.65991	.38100	3.0307	6.3093	3.91	5.05
Treatment 8	3	1.9843	.84421	.48740	-1.128	4.0815	1.35	2.94
Treatment 9	3	4.0280	.17408	.10050	3.5956	4.4604	3.83	4.13
Treatment 10	3	3.2800	.40175	.23195	2.2820	4.2780	2.84	3.62
Treatment 11	3	4.2267	.65898	.38046	2.5897	5.8637	3.64	4.94
Treatment 12	3	3.6170	.52462	.30289	2.3138	4.9202	3.02	4.01
control	3	3.6023	.12910	.07453	3.2816	3.9230	3.48	3.74
Total	39	3.8962	.77356	.12387	3.6454	4.1469	1.35	5.11
Treatment 1	3	19.1063	1.21752	.70294	16.0818	22.1308	17.89	20.33
Treatment 2	3	16.9573	1.78751	1.03202	12.5169	21.3978	15.23	18.80
Treatment 3	3	16.2717	3.38673	1.95533	7.8586	24.6848	12.85	19.62

Dry weight

Yield

Treatment 4	3	19.2253	1.92314	1.11032	14.4480	24.0027	17.78	21.41
Treatment 5	3	17.6450	2.70527	1.56189	10.9247	24.3653	15.78	20.75
Treatment 1	3	18.6847	2.83767	1.63833	11.6355	25.7338	16.18	21.77
Treatment 1	3	18.6883	1.18422	.68371	15.7466	21.6301	17.66	19.99
Treatment 8	3	36.8910	23.58735	13.61816	-21.7032	95.4852	21.81	64.07
Treatment 9	3	18.5320	1.06742	.61628	15.8804	21.1836	17.60	19.70
Treatment 10	3	14.9140	.95478	.55124	12.5422	17.2858	14.06	15.94
Treatment 11	3	17.9530	.71992	.41565	16.1646	19.7414	17.26	18.69
Treatment 12	3	15.8470	1.23685	.71409	12.7745	18.9195	14.43	16.67
control	3	18.6110	.98631	.56945	16.1609	21.0611	17.72	19.67
Total	39	19.1790	7.74693	1.24050	16.6677	21.6902	12.85	64.07
Treatment 1	3	7.5693	1.20946	.69828	4.5649	10.5738	6.33	8.75
Treatment 2	3	6.7110	.77502	.44746	4.7857	8.6363	5.83	7.30
Treatment 3	3	7.4583	.79386	.45833	5.4863	9.4304	7.00	8.38
Treatment 4	3	7.7083	1.00260	.57885	5.2177	10.1989	6.75	8.75
Treatment 5	3	7.1000	1.64621	.95044	3.0106	11.1894	5.20	8.10
Treatment 1	3	6.9250	.80117	.46256	4.9348	8.9152	6.00	7.40
Treatment 1	3	8.1667	.66650	.38480	6.5110	9.8223	7.50	8.83
Treatment 8	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Treatment 9	3	6.8890	1.34754	.77800	3.5415	10.2365	5.33	7.67
Treatment 10	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Treatment 11	3	6.5553	.29248	.16887	5.8288	7.2819	6.25	6.83
Treatment 12	3	6.5500	.39686	.22913	5.5641	7.5359	6.25	7.00

Length of Fruiting
body

control	3	7.6250	.12500	.07217	7.3145	7.9355	7.50	7.75
Total	39	6.0968	2.76834	.44329	5.1994	6.9942	.00	8.83
Treatment 1	3	43.6667	1.99348	1.15094	38.7146	48.6187	42.00	45.88
Treatment 2	3	47.8140	3.39218	1.95847	39.3874	56.2406	44.17	50.88
Treatment 3	3	55.1000	12.33815	7.12344	24.4503	85.7497	42.00	66.50
Treatment 4	3	39.0417	2.37938	1.37374	33.1310	44.9524	36.75	41.50
Treatment 5	3	45.8693	3.13547	1.81026	38.0804	53.6583	43.33	49.38
Treatment 1	3	56.0917	12.50701	7.22092	25.0225	87.1608	42.00	65.88
Total of Fruiting bodies	3	52.6670	8.76071	5.05800	30.9042	74.4298	44.17	61.67
Treatment 8	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Treatment 9	3	40.3333	10.17046	5.87192	15.0685	65.5982	28.67	47.33
Treatment 10	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Treatment 11	3	45.1530	4.36859	2.52221	34.3008	56.0052	42.17	50.17
Treatment 12	3	52.3973	3.82877	2.21054	42.8862	61.9085	48.17	55.63
control	3	35.2917	3.10326	1.79167	27.5827	43.0006	32.75	38.75
Total	39	39.4943	18.91519	3.02886	33.3627	45.6259	.00	66.50

Table 28 แสดง ANOVA ปริมาณสารคอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน การเจริญเติบโต กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Cordycepin	Between Groups	209228181.684	12	17435681.807	13824.426	.000
	Within Groups	32791.794	26	1261.223		
	Total	209260973.478	38			
Adenosin	Between Groups	8458147.304	12	704845.609	67.346	.000
	Within Groups	272115.465	26	10465.979		
	Total	8730262.770	38			
FRAP	Between Groups	22.292	12	1.858	606.066	.000
	Within Groups	.080	26	.003		
	Total	22.372	38			
DPPH	Between Groups	.988	12	.082	12.152	.000
	Within Groups	.176	26	.007		
	Total	1.164	38			
TPC	Between Groups	191.916	12	15.993	56.110	.000
	Within Groups	7.411	26	.285		
	Total	199.327	38			
TFC	Between Groups	36.471	12	3.039	148.591	.000
	Within Groups	.532	26	.020		
	Total	37.003	38			
Fresh weight	Between Groups	918.951	12	76.579	7.007	.000
	Within Groups	284.138	26	10.928		
	Total	1203.089	38			
Dry weight	Between Groups	16.888	12	1.407	6.254	.000
	Within Groups	5.851	26	.225		
	Total	22.739	38			
Yeild	Between Groups	1084.457	12	90.371	1.964	.073
	Within Groups	1196.108	26	46.004		
	Total	2280.566	38			
Length of Fruiting body	Between Groups	272.081	12	22.673	30.801	.000
	Within Groups	19.139	26	.736		
	Total	291.220	38			
Total of Fruiting bodies	Between Groups	12469.432	12	1039.119	23.986	.000
	Within Groups	1126.382	26	43.322		
	Total	13595.814	38			

Table 29 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารคอร์เตซิโบนในเนื้อถั่วงอกแช่สีทอง

Cordycepin																	
Duncan ^a																	
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
Treatment 1	3	1846.9852															
Treatment 5	3		2127.0441														
Treatment 3	3			2350.5594													
Treatment 12	3				3141.0444												
Treatment 1	3					3605.8381											
Treatment 4	3						3751.8245										
Treatment 1	3							4115.2535									
Treatment 9	3								4185.4169								
control	3									4553.2350							
Treatment 2	3										4712.5467						
Treatment 11	3											5403.5711					
Treatment 10	3												8587.7591				
Treatment 8	3													10105.8869			
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Table 30 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารอะดีโนซีนในเนยที่ดั่งเข้าสี่ทอง

Adenosine														
Duncan ^a														
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8					
Treatment 1	3	283.9684												
Treatment 5	3		759.2067											
Treatment 1	3			972.3395										
Treatment 3	3				976.3119									
Treatment 9	3					978.2658								
Treatment 11	3						1074.4620							
Treatment 4	3							1146.7155						
Treatment 8	3								1208.2034					
Treatment 10	3									1221.4789				
Treatment 12	3										1320.0638			
Treatment 1	3											1375.9947		
control	3												1506.9934	
Treatment 2	3													2419.0075
Sig.		1.000	1.000	.071	.118	.067	.076	.129						1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Table 31 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

FRAP										
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Treatment 5	3	2.0010g								
Treatment 3	3	2.0630g								
Treatment 1	3		2.1707g							
Treatment 12	3			2.4443g						
control	3			2.4637g						
Treatment 9	3			2.4870g						
Treatment 11	3			2.5140g						
Treatment 1	3				2.6313f					
Treatment 1	3					2.7580e				
Treatment 4	3						2.9237d			
Treatment 2	3							3.4490c		
Treatment 10	3								4.2103b	
Treatment 8	3									4.5270a
Sig.		.182	1.000	.170	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Table 32 แสดงตาราง Duncan กิจกรรมกรรมการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ของที่ดั่งเข้าสู่สีทอง

		DPPH				
		Duncan ^a				
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Treatment 3	3	2.6315				
Treatment 1	3	2.6352				
Treatment 5	3	2.6425				
Treatment 4	3	2.7484	2.7484			
Treatment 11	3		2.8519			
control	3		2.8642	2.8642		
Treatment 12	3		2.8949	2.8949	2.8949	
Treatment 2	3			3.0070	3.0070	3.0070
Treatment 1	3			3.0107	3.0107	3.0107
Treatment 9	3			3.0156	3.0156	3.0156
Treatment 10	3			3.0156	3.0156	3.0156
Treatment 1	3				3.0402	3.0402
Treatment 8	3					3.0722
Sig.		.122	.055	.056	.066	.401

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Table 33 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบที่ผิดปกติทั้งหมดของเมล็ดงาเข้าสีทอง

TPC							
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Treatment 1	3	6.6857					
Treatment 9	3		7.8330				
Treatment 5	3		8.4420				
Treatment 3	3			9.6893			
Treatment 11	3			9.9210			
Treatment 12	3				10.9840		
control	3				11.1720		
Treatment 1	3				11.4207		
Treatment 10	3				11.7297		
Treatment 1	3					12.7943	
Treatment 4	3					12.8243	
Treatment 2	3					13.4247	
Treatment 8	3						14.5927
Sig.		1.000	.174	.600	.129	.183	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Table 34 แสดงตาราง Duncan ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

TFC						
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Treatment 1	3	.3973				
Treatment 4	3	.4773				
Treatment 5	3		.7340			
Treatment 9	3		.7573			
Treatment 8	3		.7940			
Treatment 1	3		.8740	.8740		
Treatment 3	3		.8773	.8773		
Treatment 1	3		.8940	.8940		
Treatment 10	3			1.0607		
Treatment 2	3			1.1173	1.1173	
control	3				1.3573	
Treatment 11	3				1.3607	
Treatment 12	3					4.3707
Sig.		.499	.238	.072	.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Table 35 แสดงตาราง Duncan ปริมาณน้ำหนักสดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Fresh weight			
Duncan ^a			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Treatment 8	3	6.0690	
control	3		19.4867
Treatment 9	3		20.0967
Treatment 11	3		21.6667
Treatment 10	3		22.1637
Treatment 4	3		22.2923
Treatment 12	3		22.4123
Treatment 1	3		22.6430
Treatment 1	3		23.0200
Treatment 1	3		23.0417
Treatment 2	3		25.3567
Treatment 3	3		25.9247
Treatment 5	3		25.9537
Sig.		1.000	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Table 36 แสดงตาราง Duncan ปริมาณน้ำหนักแห้งของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Dry weight					
Duncan ^a					
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Treatment 8	3	1.9843			
Treatment 10	3		3.2800		
control	3		3.6023	3.6023	
Treatment 12	3		3.6170	3.6170	
Treatment 3	3		4.0207	4.0207	4.0207
Treatment 9	3		4.0280	4.0280	4.0280
Treatment 1	3		4.0943	4.0943	4.0943
Treatment 4	3			4.2027	4.2027
Treatment 1	3			4.2030	4.2030
Treatment 11	3			4.2267	4.2267
Treatment 2	3			4.2370	4.2370
Treatment 5	3			4.4843	4.4843
Treatment 1	3				4.6700
Sig.		1.000	.073	.061	.161

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Table 37 แสดงตาราง Duncan ปริมาณผลผลิตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Yeild			
Duncan ^a			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Treatment 10	3	14.9140	
Treatment 12	3	15.8470	
Treatment 3	3	16.2717	
Treatment 2	3	16.9573	
Treatment 5	3	17.6450	
Treatment 11	3	17.9530	
Treatment 9	3	18.5320	
control	3	18.6110	
Treatment 1	3	18.6847	
Treatment 1	3	18.6883	
Treatment 1	3	19.1063	
Treatment 4	3	19.2253	
Treatment 8	3		36.8910
Sig.		.509	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Table 38 แสดงตาราง Duncan ความยาวดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Length of Fruiting body			
Duncan ^a			
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Treatment 8	3	.0000	
Treatment 10	3	.0000	
Treatment 12	3		6.5500
Treatment 11	3		6.5553
Treatment 2	3		6.7110
Treatment 9	3		6.8890
Treatment 1	3		6.9250
Treatment 5	3		7.1000
Treatment 3	3		7.4583
Treatment 1	3		7.5693
control	3		7.6250
Treatment 4	3		7.7083
Treatment 1	3		8.1667
Sig.		1.000	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



Table 39 แสดงตาราง Duncan ปริมาณดอกทั้งหมดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Total of Fruiting bodies					
Duncan ^a					
ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Treatment 8	3	.0000			
Treatment 10	3	.0000			
control	3		35.2917		
Treatment 4	3		39.0417		
Treatment 9	3		40.3333	40.3333	
Treatment 1	3		43.6667	43.6667	43.6667
Treatment 11	3		45.1530	45.1530	45.1530
Treatment 5	3		45.8693	45.8693	45.8693
Treatment 2	3		47.8140	47.8140	47.8140
Treatment 12	3			52.3973	52.3973
Treatment 1	3			52.6670	52.6670
Treatment 3	3				55.1000
Treatment 1	3				56.0917
Sig.		1.000	.051	.054	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวจิตรสุดา กุลวัฒน์
วันเกิด	วันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 4 ซอยนครสวรรค์ 18/1 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม รหัสไปรษณีย์ 44000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	กลุ่มสาขาวิชาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2545 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเทศบาลศรีสวัสดิ์วิทยา พ.ศ. 2548 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสารคามพิทยาคม พ.ศ. 2551 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2564 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	พ.ศ. 2561 ทุนสนับสนุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โครงการพัฒนาศักยภาพบุคลากร STEM เพื่อการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรม
ผลงานวิจัย	1. Kullawat, J., Chottanom, P. and Butkhip, L., V.(2020) In Vitro Cytotoxicity of Cordyceps militaris Extracts on Different Human Cancer Cell Lines. The 7th ICoFAB 2020 Proceedings, 29 & 30 July 2020 at virtual conference. (Poster presentation) 2. Kullawat, J., Chottanom, P. and Butkhip, L., V.(2020) Enhancement of Cordycepin, Adenosine in the Cultivation of Cordyceps militaris by Elicitation. The 7th ICoFAB 2020 Proceedings, 29 & 30 July 2020 at virtual conference. (Poster presentation) 3. สุจิตรา ยาหอม, จิตรสุดา กุลวัฒน์ และเบญจพร บุราณรัตน์ (2020). การตรวจสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบเพกา. KKU Sci. J.

48(2) 200-207

4. สุจิตรา ยาหอม, จิตรสุดา กุลวัฒน์ และสุทธีวรรณ ธรรมวัตร. (2019). การเก็บและรักษาสภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ. *Journal of Science & Technology MSU*, 38(1).
5. Thanchomnang, T., Intapan, P. M., Sanpool, O., Rodpai, R., Tourtip, S., Yahom, S., and Maleewong, W. (2017). First molecular identification and genetic diversity of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* in human communities having contact with long-tailed macaques in Thailand. *Parasitology Research*, 116(7), 1917-1923.
6. Yahom, S., Kullawat, J., Boonsai, D., Chatuphonprasert, W., Thanchomnang, T. and Radomyos, P. (2013). The prevalence of intestinal parasitic infections in Maha Sarakham and Kalasin provinces. *Journal of Tropical Medicine & Parasitology*, 36(1), 29-33.

