การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืชและแมลงในท้องถิ่นและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*

รัฐพล ศรประเสริฐ* และ อนงคณ์ หัมพานนท์
อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม
สยาม อรุณศรีมรกต
รองศาสตราจารย์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 08-7325-9673 อีเมล: sornprasert_r@hotmail.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2015.12.002
รับเมื่อ 23 กันยายน 2558 ตอบรับเมื่อ 16 ธันวาคม 2558 เผยแพร่ออนไลน์ 15 มกราคม 2559
© 2016 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ด้วยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล และสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม (Glucose 15.0, Peptone 10.0, Yeast Extract 10.0, Dihydrogen Potassium Phosphate 1.0, Magnesium Sulfate 0.5 และ Thiamine 0.5 กรัม ผสมลงในน้ำต้มมันฝรั่ง 1,000 มิลลิลิตร) พบว่าเส้นใย *C. militaris* สามารถเจริญได้ดีและพัฒนาเป็น Stroma ที่มีสีส้ม รูปร่างกระบอง เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรเมล็ดข้าวหอมนิลมีปริมาณสาร Adenosine 103.47 และ Cordycepin 209.42 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรกระชอนผสมอาหารเสริมมีปริมาณสาร Adenosine 156.73 และ Cordycepin 208.17 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง สำหรับผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ที่ความเข้มข้น 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ส่วนในล้านส่วน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*

คำสำคัญ: *Cordyceps militaris* ข้าวหอมนิล กระชอน *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*

การอ้างอิงบทความ: รัฐพล ศรประเสริฐ, สยาม อรุณศรีมรกต, และ อนงคณ์ หัมพานนท์, "การเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืชและแมลงในท้องถิ่นและประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Trichophyton rubrum* และ *Staphylococcus aureus*," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*, ปีที่ 26, ฉบับที่ 2, หน้า 239–251, พ.ค.–ส.ค. 2559

Cultivation of *Cordyceps militaris* Using Different Cereal Grains and Local Insects and Inhibitory Efficiency Against *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*

Ratapol Sornprasert and Anong Hambananda***
Lecturer, Program of Biology, Faculty of Science, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok, Thailand

Sayam Aroonsrimorakot
Associate Professor, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 08-7325-9673, E-mail: sornprasert_r@hotmail.com DOI: 10.14416/j.kmutnb.2015.12.002
Received 23 September 2015; Accepted 16 December 2015; Published online: 15 January 2016
© 2016 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Cultivation of *Cordyceps militaris* with the Black jasmine rice and Mole cricket formulas mixed with supplemented nutrient (Glucose 15.0, Peptone 10.0, Yeast Extract 10.0, Dihydrogen Potassium Phosphate 1.0, Magnesium Sulfate 0.5 and Thiamine 0.5 g mixed in 1,000 ml of water obtained from boiling potatoes). The study found that the mycelium of *C. militaris* could grow and develop and become orange Stroma, with clavate shape. When cultivated in Black jasmine rice formula, Adenosine 103.47 and Cordycepin 209.42 mg/100 g dry weight were found. Regarding the other formula of Mole cricket with the supplement nutrient, Adenosine 156.73 and Cordycepin 208.17 mg/100 g dry weight were found. The results of crude extracts from Stroma with the concentration of 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 and 100,000 ppm showed the ability to inhibit growth of *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Cordyceps militaris*, Black jasmine rice, Mole cricket, *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*

Please cite this article as: R. Sornprasert, S. Aroonsrimorakot, and A. Hambananda, "Cultivation of *Cordyceps militaris* using different cereal grains and local insects and inhibitory efficiency against *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*," *The Journal of KMUTNB.*, vol. 26, no. 2, pp. 239–251, May.–Aug. 2016 (in Thai).

1. บทนำ

ราแมลง (Insect Fungi) เป็นรากลุ่มหนึ่งที่ดำรงชีวิตแบบปรสิตในสัตว์จำพวกแมลงและแมงมุม มีหลายชนิดนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยบำบัดอาการ เช่น โรคมะเร็ง ลดคอเลสเตอรอล [1] ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* [2] เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Clostridium paraputrificum*, *Escherichia coli* [3]–[5] และเชื้อไวรัสตับอักเสบซี [6] สกุล *Cordyceps* เป็นราแมลงที่คาดว่ามีมากกว่า 300 ชนิด ประมาณ 78 ชนิด ที่เก็บรวบรวมและศึกษารูปร่างลักษณะ [7] ชนิดที่รู้จักกันดี คือ *C. sinensis* (Berk.) Sacc. เจริญได้ในพื้นที่จำกัดแถบเทือกเขาหิมาลัยและเขาสูงในสาธารณรัฐประชาชนจีน มีราคาจำหน่ายสูง แพทย์แผนจีนใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้อาการผิดปกติของไต [8]–[10] มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ Adenosine และ Cordycepin [11] ถึงแม้ว่า *C. sinensis* เป็นชนิดที่ได้รับความนิยม แต่ก็มีอีกชนิดหนึ่งที่พบว่ามีสรรพคุณทางเภสัช มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกันและไม่มีพิษต่อผู้บริโภคคือ *C. militaris* (L.) Link [7], [12] จากข้อมูลปี 2008 โดยศูนย์ติดตามการตลาดของจีน รายงานว่าความต้องการ *C. militaris* ของตลาดนานาชาติอยู่ที่ 1,000 ตันต่อปี ขณะที่ตลาดในสาธารณรัฐประชาชนจีนอยู่ที่ 500 ตันต่อปี อัตราการเติบโตของตลาดอยู่ที่ 13 เปอร์เซ็นต์ แต่มีกำลังการผลิตเพียง 250 ตันต่อปี [13] ทำให้ปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เนื่องจากเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยง *C. militaris* ยังมีข้อมูลจำกัดและไม่เป็นที่เปิดเผยในทางการค้า โดยเฉพาะในประเทศไทย จึงทำให้ *C. militaris* มีราคาสูงถึง 10,000–15,000 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด การเพาะเลี้ยง *C. militaris* พบว่า มีการใช้ดักแด้ไหมหรือเมล็ดพืชเป็นวัสดุเพาะ ได้แก่ ข้าวฟ่าง ไม้กวาดข้าวฟ่าง ข้าวโพด และข้าวเหนียว ดังนั้นเป็นเหตุให้ผู้วิจัยสนใจที่จะนำวัสดุที่มีอยู่อย่างหลากหลายในธรรมชาติหรือหาได้ในท้องถิ่นมาเพาะเลี้ยง *C. militaris* ได้ Stroma ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อรา *Trichophyton rubrum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคกลากที่ผิวหนัง ผม ขน และเล็บ เป็นโรคที่ยากต่อการฟื้นคืนสภาพให้เป็นปกติ แต่สามารถหายได้เอง ถ้ามีการติดเชื้อปริมาณไม่มากหรือตรวจพบในระยะเริ่มต้น [14] และเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อสาเหตุทำให้เกิดฝีหนอง ซึ่งมีแนวโน้มดื้อยามากขึ้น [15] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืชและแมลง แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก Stroma และศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืช

2.1.1 การเตรียมเชื้อ

เชื้อ *C. militaris* จาก Mianyang Edible Fungi Research Institute, China เลี้ยงบน PDA ในจานเพาะเชื้อบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 25 วัน เมื่อครบกำหนด ใช้ Cork Borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณรอบนอกโคโลนีให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย

2.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารหลัก: เมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าว มันปู เมล็ดข้าวสังข์หยด เมล็ดข้าวหอมนิล เมล็ดข้าวสาลี และเมล็ดเดือย แช่น้ำสะอาด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดใช้ตะแกรงกรองให้สะเด็ดน้ำ นำอาหารหลักแต่ละชนิดบรรจุลงในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 480 มิลลิลิตร จำนวน 20 กรัมต่อขวด **อาหารเสริม**: Glucose 15.0, Peptone 10.0, Yeast Extract 10.0, Dihydrogen Potassium Phosphate 1.0, Magnesium Sulfate 0.5 และ Thiamine 0.5 กรัม ผสมลงในน้ำต้มมันฝรั่ง ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (มันฝรั่ง 400 กรัม น้ำกรองปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปต้ม)

2.1.3 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำขวดเพาะเลี้ยงจากข้อ 2.1.2 มาเติมอาหารเสริมปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อจากข้อ

2.1.1 จำนวน 3 ชิ้น ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด เมื่อเส้นใยเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่ 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน

2.1.4 การตรวจและการบันทึกผลการทดลอง

การเปลี่ยนสีของเส้นใย ความหนาแน่นของเส้นใย อายุการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 5 สิ่งทดลอง ๆ ละ 7 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

2.2 การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยแมลง

2.2.1 การเตรียมเชื้อ เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำแมลง 4 ชนิด ได้แก่ ดักแด้ไหม กระชอน จิ้งหรีด และตั๊กแตนปาทังก้า มาล้างในน้ำสะอาด ใช้ตะแกรงกรองให้สะเด็ดน้ำ แบ่งแมลง เป็น 2 ชุด ได้แก่ **ชุดที่ 1**: แมลงแต่ละชนิดบรรจุลงในขวดเพาะเลี้ยง จำนวน 50 กรัมต่อขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร และ**ชุดที่ 2**: แมลงแต่ละชนิดบรรจุลงในขวดเพาะเลี้ยง จำนวน 50 กรัมต่อขวด จากนั้นนำอาหารเสริมผสมผงวุ้น 15 กรัม เติมลงในขวดเพาะเลี้ยง ปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อขวด ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ได้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 สูตร

2.2.3 การถ่ายเชื้อและการบ่มเชื้อ

นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อจากข้อ 2.1.1 จำนวน 3 ชิ้น ถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด จนเส้นใยเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อวัน

2.2.4 การตรวจและการบันทึกผลการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2.1.4 วางแผนการทดลองแบบสุ่ม สมบูรณ์ 8 สิ่งทดลอง ๆ ละ 7 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก Stroma

การวิเคราะห์ปริมาณสาร Adenosine และ Cordycepin จาก Stroma ด้วยวิธีการดัดแปลงของ Huang *et al*. [29] โดยนำ Stroma จากข้อ 2.1 และ 2.2 ที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Waters 600 Controller ระบบฉีดสารอัตโนมัติแบบ Waters 717 Plus Autosampler ชนิดตัวตรวจวัด Waters 2996 Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณสารใช้เฟสเคลื่อนที่ ในอัตราส่วนของเมทานอล: น้ำ (15 : 85) อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร เวลาในการวิเคราะห์ 18 นาที และใช้คอลัมน์ Phenomenex Luna C18(2) ขนาด 2.6 × 150.0 มิลลิเมตร สารมาตรฐาน Adenosine และ Cordycepin ของ Sigma-Aldrich

2.4 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

2.4.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำ Stroma จากการเพาะในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาอบแห้ง 50 กรัม บดเป็นผงใส่ลงไปในขวดแก้วที่เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ [4] ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดกรองแยกกากออก ได้ของเหลวผลกรอง 1 (Filtrate 1) และแช่ซ้ำอีก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองแยกกากออกได้ของเหลวผลกรอง 2 (Filtrate 2) รวมของเหลวผลกรอง 1 และ 2 นำไประเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 50 มิลลิบาร์ จนได้ของเหลวข้น เพื่อรอการทดสอบ

2.4.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อรา *T. rubrum* DMST43531 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลี้ยงบน PDA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดใช้

Cork Borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีให้ได้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 เลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–8 ชั่วโมง ให้มีความขุ่นเทียบกับ 0.5 McFarland Standard

2.4.3 การทดสอบสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

ทดสอบสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเชื้อรา ด้วย Poisoned Food Technique [16] โดยนำสารสกัดหยาบผสมใน PDA ที่ 45 องศาเซลเซียส ให้มีความเข้มข้นสารสกัดหยาบ คือ 0, 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ส่วนในล้านส่วน ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเมื่ออาหารเย็นลง ถ่ายเชื้อ *T. rubrum* ลงบนกลางผิวหน้า PDA การตรวจและบันทึกผลการทดลอง: วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ทำการวัดเมื่อโคโลนีเชื้อราบนจานเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยคำนวณได้จากสูตร เมื่อ A คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *T. rubrum* บน PDA (ชุดควบคุม) และ B คือค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี *T. rubrum* บน PDA ผสมสารสกัดหยาบ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

ทดสอบสารสกัดหยาบต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วย Disc Diffusion Technique [17] โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อให้ชุ่มแล้วบิดพอหมาด นำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้า Nutrient Agar (NA) ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0, 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ส่วนในล้านส่วน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบน Paper Disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้ววางบนผิวหน้า NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การตรวจและบันทึกผลการทดลอง: วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบ Paper Disc โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 6 สิ่งทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3. ผลและอภิปรายผล

3.1 การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืช

การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยเมล็ดธัญพืช เป็นระยะเวลา 60 วัน ได้ผลการวิเคราะห์ข้อมูล (ตารางที่ 1) ดังนี้

ตารางที่ 1 สีของเส้นใย ความหนาแน่นของเส้นใย การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma ด้วยเมล็ดธัญพืช

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นใย		ความหนาแน่นของเส้นใย เมื่ออายุ 30 วัน	*การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (วัน)	การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก		*การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma			
	การเปลี่ยนสี	อายุ (วัน)			*อายุ (วัน)	เมื่ออายุ 40 วัน	อายุ (วัน)	เมื่ออายุ 60 วัน		
								จำนวน (ดอก) /สี/รูปร่าง	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด (กรัม)
1. เมล็ดข้าวมันปู	✓	38.00	++	36.14^{ก}	38.57^{ก}	××	41.14^{ขค}	5.00^{ข}/สีส้ม/กระบอง	4.45^{ขค}	3.01^{ข}
2. เมล็ดข้าวสังข์หยด	✓	34.00	++	32.43^{ก}	39.57^{ก}	××	42.71^{กค}	5.71^{ข}/สีส้ม/กระบอง	4.04^{กข}	2.66^{ข}
3. เมล็ดข้าวหอมนิล	✓	37.00	++	35.43^{ก}	38.29^{ก}	×××	39.14^{ข}	11.57^{ค}/สีส้ม/กระบอง	4.55^{ค}	6.08^{ค}
4. เมล็ดข้าวสาลี	✓	30.00	+++	28.29^{ข}	35.14^{ข}	×××	41.71^{ขค}	5.86^{ข}/สีส้ม/กระบอง	4.04^{กข}	2.71^{ข}
5. เมล็ดเดือย	✓	34.00	+++	32.43^{ก}	38.57^{ก}	×××	45.14^{ก}	3.71^{ก}/สีส้ม/กระบอง	3.62^{ก}	1.64^{ก}

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 7 ซ้ำ ✓ คือสีขาวเป็นสีเหลืองปนสีส้ม + คือความหนาแน่นของเส้นใยน้อย ++ คือความหนาแน่นของเส้นใยปานกลาง +++ คือความหนาแน่นของเส้นใยมาก × คือจำนวนตุ่มดอกน้อย ×× คือจำนวนตุ่มดอกปานกลาง ××× คือจำนวนตุ่มดอกมาก และตัวอักษรที่อยู่บนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

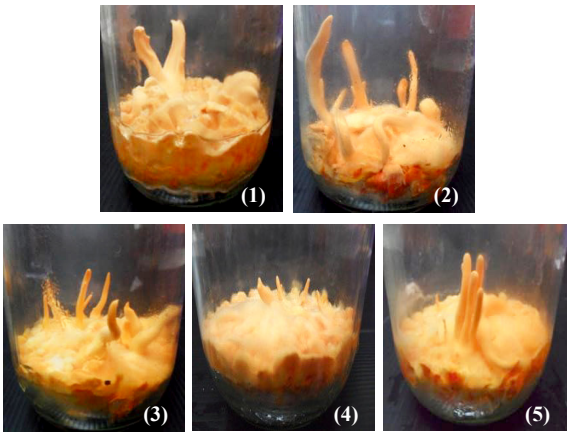
การเปลี่ยนสีของเส้นใย พบว่า สูตรเมล็ดข้าวสาลีเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองปนสีส้มเร็วที่สุด รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด สูตรเมล็ดเดือย สูตรเมล็ดข้าวหอมนิล และสูตรเมล็ดข้าวมันปู ตามลำดับ

ความหนาแน่นของเส้นใยเมื่ออายุ 30 วัน พบว่าสูตรเมล็ดข้าวสาลี และสูตรเมล็ดเดือย เส้นใยหนาแน่นมาก ส่วนสูตรเมล็ดข้าวมันปู สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยดและสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล เส้นใยหนาแน่นปานกลาง

การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรเมล็ดข้าวสาลี มีอายุการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุด (28.29 วัน) รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด สูตรเมล็ดเดือย สูตรเมล็ดข้าวหอมนิล และสูตรเมล็ดข้าวมันปูเมื่ออายุเฉลี่ย 32.43, 32.43, 35.43 และ 36.14 วัน ตามลำดับ

การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่าสูตรเมล็ดข้าวสาลีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับสูตรเมล็ดข้าวชนิดอื่นๆ โดยสูตรเมล็ดข้าวสาลี มีอายุการพัฒนาเร็วที่สุด (35.14 วัน) รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวหอมนิล สูตรเมล็ดข้าวมันปู สูตรเมล็ดเดือย และสูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด เมื่ออายุเฉลี่ย 38.29, 38.57, 38.57 และ 39.57 วัน ตามลำดับ สำหรับจำนวนตุ่มดอก เมื่ออายุ 40 วัน พบว่าสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล สูตรเมล็ดข้าวสาลี และสูตรเมล็ดเดือย มีจำนวนตุ่มดอกมาก สูตรเมล็ดข้าวมันปูและสูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด มีจำนวนตุ่มดอกปานกลาง

การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล มีอายุการพัฒนาเร็วที่สุด (39.14 วัน) รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวมันปู สูตรเมล็ดข้าวสาลี สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด และสูตรเมล็ดเดือย เมื่ออายุเฉลี่ย 41.14, 41.71, 42.71 และ 45.14 วัน ตามลำดับ จำนวน Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล มีจำนวนมากที่สุด (11.57 ดอก)



รูปที่ 1 การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma ในสูตรเมล็ดธัญพืช: สูตรเมล็ดข้าวมันปู (1) สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด (2) สูตรเมล็ดข้าวหอมนิล (3) สูตรเมล็ดข้าวสาลี (4) และสูตรเมล็ดเดือย (5)

รองลงมาคือ สูตรเมล็ดข้าวสาลี สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด สูตรเมล็ดข้าวมันปูและสูตรเมล็ดเดือยมีจำนวนเฉลี่ย 5.86, 5.71, 5.00 และ 3.71 ดอก ตามลำดับ เมื่อสังเกตสีและรูปร่างของ Stroma พบว่า มีสีส้ม รูปร่างกระบอง (Clavate) ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร ความยาว Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิลมีความยาวมากที่สุด (4.55 เซนติเมตร) รองลงมาคือสูตรเมล็ดข้าวมันปู สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด สูตรเมล็ดข้าวสาลี และสูตรเมล็ดเดือย มีความยาวเฉลี่ย 4.45, 4.04, 4.04 และ 3.62 เซนติเมตร ตามลำดับ น้ำหนักสด Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล มีน้ำหนักสดมากที่สุด (6.08 กรัม) รองลงมา คือ สูตรเมล็ดข้าวมันปู สูตรเมล็ดข้าวสาลี สูตรเมล็ดข้าวสังข์หยด และสูตรเมล็ดเดือย มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 3.01, 2.71, 2.66 และ 1.64 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 1)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *C. militaris* สามารถเจริญได้บนเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิด โดยเฉพาะสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล ให้จำนวน Stroma มากกว่าสูตรอื่นๆ อาจเนื่อง

มาจากในเมล็ดพืช มีปริมาณโปรตีน 12.56 กรัม และโพแทสเซียม 339.40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ที่มากกว่าเมล็ดข้าวสาลี เมล็ดข้าวสังข์หยด เมล็ดข้าวมันปู และเมล็ดเดือย [18], [19] นอกจากนี้ยังมีเมล็ดพืชชนิดอื่นๆ ที่ *C. militaris* สามารถเจริญได้ เช่น เมล็ดข้าวฟ่างไม้กวาด เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดข้าวโพด และเมล็ดข้าวเหนียว [20]–[22] ซึ่งวัสดุดังกล่าวหาได้ง่ายในท้องถิ่นและราคาต่อหน่วยไม่สูง ประกอบกับราคาจำหน่าย *C. militaris* มีราคาสูงเป็นที่จูงใจต่อผู้ที่จะเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองสูตรอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 5 สูตร ต้องมีการเติมอาหารเสริม เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ Glucose แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ Peptone, Yeast Extract แหล่งแร่ธาตุ ได้แก่ Dihydrogen Potassium Phosphate, Magnesium Sulfate และแหล่งวิตามิน ได้แก่ Thiamine เนื่องจากอาหารเสริมดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมการเจริญของ *C. militaris* [22], [23]

3.2 การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยแมลง

การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ด้วยแมลง เป็นระยะเวลา 60 วัน ได้ผลการวิเคราะห์ข้อมูล (ตารางที่ 2) ดังนี้

การเปลี่ยนสีของเส้นใย พบว่า สูตรดักแด้ไหม และสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม เส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองปนสีส้มเร็วที่สุด รองลงมา คือสูตรกระชอน สูตรกระชอนผสมอาหารเสริม สูตรจิ้งหรีด สูตรตั๊กแตนปาทังก้า สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม และสูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม ตามลำดับ

ความหนาแน่นของเส้นใย เมื่ออายุ 30 วัน พบว่า สูตรดักแด้ไหมและสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม เส้นใยหนาแน่นมาก ส่วนสูตรกระชอน สูตรจิ้งหรีด สูตรกระชอนผสมอาหารเสริม และสูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม มีความหนาแน่นปานกลาง สูตรตั๊กแตนปาทังก้าและสูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม เส้นใยหนาแน่นน้อย

ตารางที่ 2 สีของเส้นใย ความหนาแน่นของเส้นใย การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma ด้วยแมลง

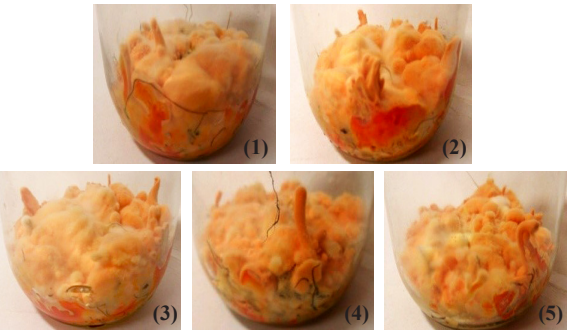
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	เส้นใย		ความหนาแน่นของเส้นใย เมื่ออายุ 30 วัน	*การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (วัน)	การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก		*การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma			
	การเปลี่ยนสี	อายุ (วัน)			*อายุ (วัน)	เมื่ออายุ 40 วัน	อายุ (วัน)	เมื่ออายุ 60 วัน		
								จำนวน (ดอก) /สี/รูปร่าง	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนักสด (กรัม)
1. ดักแด้ไหม	✓	20.00	+++	18.86^{ฆ}	29.14^{กค}	×	0^{ฆ}	0^{ค}	0^{ฆ}	0^{ค}
2. กระชอน	✓	25.00	++	23.29^{ก}	30.57^{ฆ}	××	47.43^{ค}	2.71^{ง}/สีส้ม/กระบอง	2.50^{ค}	1.23^{ง}
3. จิ้งหรีด	✓	26.00	++	24.14^{ก}	34.14^{ง}	××	43.57^{ค}	2.43^{ง}/สีส้ม/กระบอง	2.28^{ค}	1.09^{ง}
4. ตั๊กแตนปาทังก้า	✓	26.00	+	24.71^{ก}	33.57^{ง}	×	0^{ฆ}	0^{ค}	0^{ฆ}	0^{ค}
5. ดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม	✓	20.00	+++	18.57^{ฆ}	28.57^{ค}	××	0^{ฆ}	0^{ค}	0^{ฆ}	0^{ค}
6. กระชอนผสมอาหารเสริม	✓	25.00	++	23.57^{ก}	28.43^{ค}	×××	35.14^{ก}	6.00^{ฆ}/สีส้ม/กระบอง	3.20^{ก}	2.78^{ฆ}
7. จิ้งหรีดผสมอาหารเสริม	✓	26.00	++	24.43^{ก}	31.43^{ฆ}	×××	37.00^{ก}	4.29^{ก}/สีส้ม/กระบอง	2.92^{ก}	1.93^{ก}
8. ตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม	✓	26.00	+	24.71^{ก}	30.14^{กง}	××	37.00^{ก}	3.86^{ก}/สีส้ม/กระบอง	2.75^{ก}	1.59^{ก}

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 7 ซ้ำ ✓ คือสีขาวเป็นสีเหลืองปนสีส้ม 0 คือไม่มีการพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma + คือความหนาแน่นของเส้นใยน้อย ++ คือความหนาแน่นของเส้นใยปานกลาง +++ คือความหนาแน่นของเส้นใยมาก × คือจำนวนตุ่มดอกน้อย ×× คือจำนวนตุ่มดอกปานกลาง ××× คือจำนวนตุ่มดอกมาก และตัวอักษรที่อยู่บนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สูตรดักแด้ และสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม มีอายุการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุดเท่ากับ 18.86 และ 18.57 วันตามลำดับ โดยแตกต่างกับสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมา คือสูตรกระชอน สูตรกระชอนผสมอาหารเสริม สูตรจิ้งหรีด สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้า และสูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริมเมื่ออายุเฉลี่ย 23.29, 23.57, 24.14, 24.43, 24.71 และ 24.71 วัน ตามลำดับ

การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม มีอายุการพัฒนาของเส้นใยมากที่สุด (28.43 วัน) รองลงมาคือ สูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม สูตรดักแด้ไหม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม สูตรกระชอน สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าและสูตรจิ้งหรีด เมื่ออายุเฉลี่ย 28.57, 29.14, 30.14, 30.57, 31.43, 33.57 และ 34.14 วัน ตามลำดับ สำหรับจำนวนตุ่มดอกเมื่ออายุ 40 วัน พบว่าสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม และสูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม มีจำนวนตุ่มดอกมาก สูตรกระชอน สูตรจิ้งหรีด สูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริมและสูตรตั๊กแตนปาทังกา ผสมอาหารเสริม มีจำนวนตุ่มดอกปานกลาง สูตรดักแด้ไหม และสูตรตั๊กแตนปาทังก้า มีจำนวนตุ่มดอกน้อย

การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม มีอายุการพัฒนาเร็วที่สุด (35.14 วัน) รองลงมาคือ สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม สูตรจิ้งหรีดและสูตรกระชอนเมื่ออายุเฉลี่ย 37.00, 37.00, 43.57 และ 47.43 วัน ตามลำดับ โดยพบว่าสูตรดักแด้ไหม สูตรตั๊กแตนปาทังก้า และสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม ไม่มีการพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma โดยมีผลการศึกษาการเลี้ยง *C. khaoyaiensis*, *C. pseudomilitaris* [24] *Cordyceps* sp. [25] บนดักแด้ไหม พบว่าหลังจากปลูกเชื้อแล้วไม่สามารถพัฒนาเป็น Stroma แต่ *C. militaris* พบว่าตุ่มดอกพัฒนาเป็น Stroma ได้ [26] สำหรับจำนวน



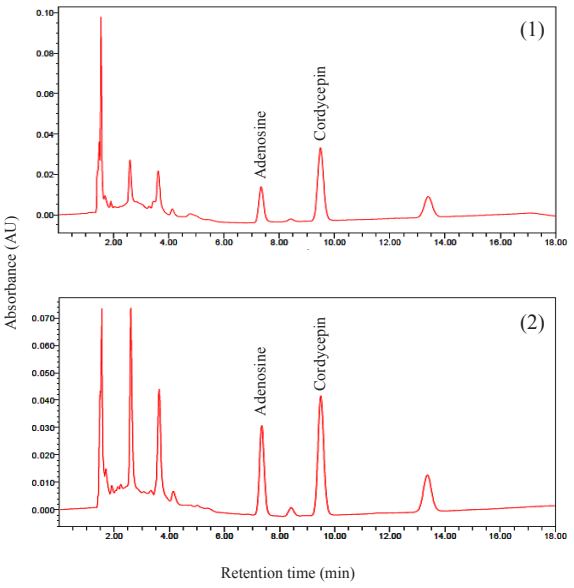
รูปที่ 2 การพัฒนาของตุ่มดอกเป็น Stroma ในสูตรแมลง: สูตรกระชอน (1) สูตรจิ้งหรีด (2) สูตรกระชอนผสมอาหารเสริม (3) สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม (4) และสูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม (5)

Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรกระชอนผสมอาหารเสริมมีจำนวนมากที่สุด (6.00 ดอก) รองลงมาคือ สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม สูตรกระชอน และสูตรจิ้งหรีด มีจำนวนเฉลี่ย 4.29, 3.86, 2.71 และ 2.43 ดอก ตามลำดับ เมื่อสังเกตสีและรูปร่างของ Stroma พบว่า มีสีส้ม รูปร่างกระบอง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 สูตร ยกเว้นสูตรดักแด้ไหม สูตรตั๊กแตนปาทังก้า และสูตรดักแด้ไหมผสมอาหารเสริม เนื่องจากไม่สร้าง Stroma ความยาว Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม มีความยาวมากที่สุด (3.20 เซนติเมตร) รองลงมาคือ สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม สูตรกระชอน และสูตรจิ้งหรีด มีความยาวเฉลี่ย 2.92, 2.75, 2.50 และ 2.28 เซนติเมตร ตามลำดับ และน้ำหนักสด Stroma เมื่ออายุ 60 วัน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสูตรกระชอนผสมอาหารเสริมมีหนักสดมากที่สุด (2.78 กรัม) รองลงมาคือ สูตรจิ้งหรีดผสมอาหารเสริม สูตรตั๊กแตนปาทังก้าผสมอาหารเสริม สูตรกระชอนและสูตรจิ้งหรีด มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.93, 1.59, 1.23 และ 1.09 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 2)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเส้นใย *C. militaris* สามารถเจริญได้บนดักแด้ไหม กระชอน จิ้งหรีด และตั๊กแตนปาทังก้า เนื่องจากเป็นเชื้อที่เข้าอาศัยและเจริญได้ในแมลงอันดับ Diptera, Hymenoptera, Isoptera และ Lepidoptera [25] แต่จากผลทดลอง พบว่าสกุล *Cordyceps* สามารถเจริญได้กับแมลงในอันดับ Orthoptera ได้แก่ กระชอน จิ้งหรีด และตั๊กแตนปาทังก้า ซึ่งน่าจะเป็นโอกาสที่จะพัฒนาด้วยการนำแมลงในอันดับอื่นๆ มาทดลองเลี้ยงสกุล *Cordyceps* เพราะแมลงมีมากถึง 30–35 อันดับ ประกอบกับแมลงหาได้ง่ายในท้องถิ่น มีทุกฤดูกาลและอุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ ที่จำเป็นต่อการเจริญของสกุล *Cordyceps* ดังนั้นสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม ให้จำนวน Stroma มากกว่าสูตรอื่น อาจเนื่องมาจากมีโปรตีน 15.40 กรัม และไขมัน 6.30 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม วิตามิน ได้แก่ Thiamine 0.20 มิลลิกรัม แร่ธาตุได้แก่ เหล็ก 41.70 มิลลิกรัม แคลเซียม 75.70 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 254.10 มิลลิกรัม โพแทสเซียม 267.80 มิลลิกรัม ในขณะที่แมลงชนิดอื่นมีปริมาณน้อยกว่า [27]

3.3 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก Stroma

วิเคราะห์ปริมาณสาร Adenosine และ Cordycepin จาก Stroma อบแห้งที่เพาะจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล และสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม Stroma มี Adenosine ใน Retention Time (R_t) ที่ 7.458 และ 7.395 นาที ตามลำดับ ใกล้เคียงกับ R_t ของ Adenosine มาตรฐานที่ 7.415 นาที ในปริมาณ 103.47 และ 156.73 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มี Cordycepin ใน R_t ที่ 9.618 และ 9.583 นาทีตามลำดับ ใกล้เคียงกับ R_t ของ Cordycepin มาตรฐานที่ 9.613 นาที ในปริมาณ 209.42 และ 208.17 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 3) ซึ่งปริมาณ Adenosine ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้พบว่ามีปริมาณที่สูง โดยมีผลการศึกษารายงานว่า Stroma ของ *C. militaris* สายพันธุ์ CMRU เพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดข้าวขาวผสมข้าวโพดบดและสารละลาย ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของ Adenosine และ Cordycepin ใน Stroma ที่เลี้ยงด้วยสูตรเมล็ดข้าวหอมนิล (1) และสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม (2)

56 วัน พบว่ามีปริมาณ Adenosine 87.87 และ Cordycepin 824.33 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง [28] แต่มีปริมาณน้อยกว่าที่มีผลการศึกษารายงานว่า Stroma ของ *C. militaris* เพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดพืช พบว่ามีปริมาณ Adenosine 245.00 และ Cordycepin 265.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง [29] อย่างไรก็ตามปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก Stroma จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยง ความเป็นกรด-เบสของอาหาร สภาวะแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาการเก็บผลผลิต และวิธีการสกัดสาร [28], [30]–[32]

3.4 ผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

ผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ที่เพาะในสูตรกระชอนผสมอาหารเสริมต่อการเจริญของ *T. rubrum* โดยสารสกัดหยาบที่ 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ

100,000 ส่วนในล้านส่วน พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 6.73, 6.45, 6.05, 5.78 และ 5.58 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ย 25.22, 28.33, 32.77, 35.77 และ 38.00 ตามลำดับ โดยมีผลการศึกษารายงานว่าสารสกัดจาก *C. militaris* ยับยั้ง *Fusarium oxysporum* [2], [33], [34]

ส่วนการเจริญของ *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบที่ 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 ส่วนในล้านส่วน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 8.33, 9.66, 10.71, 10.99 และ 12.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งสารสกัดจาก *C. militaris* เคยมีรายงานว่ายับยั้ง *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemlyticus*, *V. vulnificus* [3] *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* [4] *Clostridium paraputrificum* และ *C. perfringens* แต่ไม่ยับยั้ง *B. cereus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *S. enteric* และ *Pseudomonas aeruginosa* [5], [35]

4. สรุป

จากการวิจัยครั้งนี้ได้สูตรอาหารที่เตรียมได้จากวัสดุหลักที่หาได้ในท้องถิ่นมาเพาะเลี้ยง *C. militaris* ได้แก่ สูตรเมล็ดข้าวหอมนิล และสูตรกระชอนผสมอาหารเสริม จนเกิด Stroma ที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ Adenosine และ Cordycepin ประกอบกับได้สารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *T. rubrum* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคกลาก และ *S. aureus* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคฝีหนอง อันเป็นแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร เภสัช ผลิตภัณฑ์เวชสำอางและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] S. Mongkolsamrit, K. Tassanathai, and J. J. Luangsaard, "Diversity of insect-pathogenic fungi in Thailand," in *The Mushroom Researchers and Growers Society of Thailand*, Mushroom Thai 2009, Bangkok, 2009.

[2] B. T. Park, K. H. Na, E. C. Jung, J. W. Park, and H. H. Kim, "Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*," *Korean Journal of Physiology & Pharmacology,* vol. 13, pp. 49–54, 2009.

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดหยาบจาก Stroma ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย

สารสกัดหยาบ (ส่วนในล้านส่วน)	*T. rubrum*		*S. aureus*
	*เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	*เปอร์เซนต์การยับยั้งโคโลนี	*เส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)
0	9.00^{ฉ}	00.00^{ฉ}	0.00^{ง}
20,000	6.73^{จ}	25.22^{จ}	8.33^{ค}
40,000	6.45^{ง}	28.33^{ง}	9.66^{ขค}
60,000	6.05^{ค}	32.77^{ค}	10.71^{กข}
80,000	5.78^{ข}	35.77^{ข}	10.99^{กข}
100,000	5.58^{ก}	38.00^{ก}	12.10^{ก}

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ และตัวอักษรที่อยู่บนค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

[3] M. A. Choi, W. K. Lee, and M. S. Kim, "Identification and antibacterial activity of volatile flavor components of *Cordyceps militaris*," *Journal of Food Science and Nutrition*, vol. 4, pp. 18–22, 1999.

[4] C. S. Park, C. J. Kwon, M. A. Choi, G. S. Park, and K. H. Choi, "Antibacterial activities of *Cordyceps* spp. mugwort and pine needle extracts," *Korean Journal of Food Preservation*, vol. 9, pp. 102–108, 2002.

[5] Y. J. Ahn, S. J. Park, S. G. Lee, S. C. Shin, and D. H. Cho, "Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 2744–2748, 2000.

[6] Y. Ueda, K. Mori, S. Satoh, H. Dansako, M. Ikeda, and N. Kato, "Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 447, pp. 341–345, 2014.

[7] I. P. Hong, P. D. Kang, K. Y. Kim, S. H. Nam, M. Y. Lee, Y. S. Choi, N. S. Kim, H. K. Kim, K. G. Lee, and R. A. Humber, "Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*," *Mycobiology*, vol. 38, pp. 128–132. 2010.

[8] C. Dickinson and J. Lucas, *The Encycopedia of Mushroom*. London: Orbis Publishing, 1979.

[9] Y. Jianzhe, M. Xiaolan, L. Qiming, Z. Yichen, and W. Huaan, *Icones of Medicinal Fungi from China*. Beijing: Science Press, 1987.

[10] D. Benjamin, *Mushrooms Poisons and Panaceas: A Handbook for Naturalists*, *Mycologists and Physicians*. New York: W. H. Freeman and Company, 1995.

[11] S. Devkota, "Yarsagumba [*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.]; Traditional utilization in Dolpa district, western Nepal," *Our Nature*, vol. 4, pp. 48–52, 2006.

[12] L. Lim, C. Lee, and E. Chang, "Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes)," *International Journal of Medicinal Mushrooms*, vol. 14, pp. 181–187, 2012.

[13] National Science and Technology Development Agency, "Cultivation of *Cordyceps militaris*," in *Documentation Workshop, National Science and Technology Development Agency*, Bangkok, 2012.

[14] N. Luplertlop and S. Suwanmanee, "Dermatophytosis: from bench to bedside," *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 36, pp. 75–87, 2013.

[15] G. Pesavento, B. Ducci, N. Comodo, and A. L. Nostro, "Antimicrobial resistant profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)," *Food Control*, vol. 18, pp. 196–200, 2007.

[16] S. Anthony, K. Abeywickrama, R. Dayananda, S. Wijeratnam, and L. Arambewela, "Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils," *Mycopathologia*, vol. 157, pp. 91–97, 2004.

[17] M. P. Almajano, R. Carbó, J. A. L. Jiménez, and M. H. Gordon, "Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions," *Food Chemistry*, vol. 108, pp. 55–63, 2008.

[18] Phitsanulok Rice Research Center, *40 Years of Phitsanulok Rice Research Center*. Phitsanulok: Trakul Thai Printing, 2002.

[19] Rice Department, *Sang Yod Maung Phatthalung Rice: GI Rice*. Bangkok: Division of Rice Product Development, 2010.

[20] I. Y. Choi, J. K. Choi, W. H. Lee, Y. J. Yu, G. T. Joung, I. O. Ju, and Y. K. Choi, "The condition of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*," *Korean Journal of Mycology*, vol. 27, pp. 243–248, 1999.

[21] J. Z. Dong, C. Lei, X. R. Ai, and Y. Wang, "Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components," *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 166, pp. 1215–1224, 2012.

[22] T. C. Wen, G. R. Li, J. C. Kang, C. Kang, and K. D. Hyde, "Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*." *Chiang Mai Journal of Science*, vol. 41, pp. 858–872, 2014.

[23] J. M. Sung, Y. S. Choi, B. Shrestha, and Y. J. Park, "Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*," *Korean Journal of Mycology*, vol. 30, pp. 6–10, 2002.

[24] S. Suraporn and W. Siriwattanametanon, "Growth of *Cordyceps* spp. on the pupae of Thai silkworm, *Bombyx mori* Nanglai x 108," *Kamphaengsaen Academic J.*, vol. 7, pp. 1–9, 2009.

[25] S. Waraporn, "Development of culture media inducing stroma production of *Cordyceps* sp," *Khon Kaen Agric. J*, vol. 41, pp. 492–497, 2013.

[26] X. Mu, J. C. Fa, C. Shuai, L. C. Yu, L. Xing, L. Jiao, H. Xue, and L. X. Hong, "Effects of light hours on growth and development of *Cordyceps militaris*," *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, vol. 14, pp. 160–170, 2010.

[27] K. Wiwatphanit, *Insects are the Human Food in the Future*. Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand Printing, 1999.

[28] T. Tapingkae, M. Yachai, S. Sritiwong, K. Upalasin, A. Pornpunnawit, A. Thongthap, and W. Tapingkae, *Study on Cultivation and Utilization of Medicinal Mushroom Cordyceps Militaris*. Chiang Mai: Chiang Mai Rajabhat University, 2014.

[29] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, X. Wang, and X. Zhou, "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 3, pp. 957–961, 2009.

[30] C. Hsieh, M. Tsai, T. Hsu, D. Chang, and C. Lo, "Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps* sinensis," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 120, pp. 145–157, 2005.

[31] L. T. Hung, S. Keawsompong, V. T. Hanh, S. Sivichai, and N. L. H. Jones, "Effect of temperature on cordycepin production in *Cordyceps militaris*," *Thai Journal of Agricultural Science*, vol. 42, pp. 219–225, 2009.

[32] C. Xie, G. Liu, Z. Gu, G. Fan, L. Zhang, and Y. Gu, "Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium." *Annals of Microbiology*, vol. 59, pp. 293–299, 2009.

[33] F. S. Reis, L. Barros, R. C. Calhelha, A. Ciric, L. J. Griensven, M. Sokovic, and I. C. Ferreira, "The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant,

antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 62, pp. 91–98, 2013.

[34] K. J. Patel and R. S Ingalhalli, "*Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link – An important medicinal mushroom," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 2, pp. 315–319, 2013.

[35] K. M. Lee, I. P. Hong, S. H. Nam, G. B. Sung, and Y. H. Bae, "The Cultural characteristics and antibacterial activities of *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces tenuipes*," *Korean Journal of Applied Entomology*, vol. 47, pp. 479–486. 2008.