ผลของอายุการเก็บเกี่ยวต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนของถั่งเช่าสีทอง

Influence of Harvesting Age on Cordycepin and Adenosine Yields in *Cordyceps militaris* Fruit Bodies

ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต[1*], ธนภักษ์ อินยอด[2], ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์[2], ธนภัทร เติมอารมณ์[2] และชาตรี กอนี[3]

Natthapach Srihanant[1*], Tanapak Inyod[2], Khanitha Chawananorasest[2], Thanapat Termarom[2] and Chatree Konee[3]

Received date: 30 ก.ย. 65 Revised date: 26 ต.ค. 66 Accepted date: 30 ต.ค. 66
DOI: https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.03.24.007

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบอายุการเก็บเกี่ยวถั่งเช่าสีทองและเปรียบเทียบสูตรอาหารที่มีผลต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน แบ่งชุดการทดลองตามสูตรอาหาร 3 สูตร ได้แก่ ข้าวสังข์หยดผสมน้ำเปล่า (สูตรที่ 1) ข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง (สูตรที่ 2) และข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น (สูตรที่ 3) ร่วมกับระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ 60, 70, 80 และ 90 วัน วางแผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design, RCBD) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด ผลการศึกษาพบว่าผลผลิต ปริมาณสารสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยอาหารสูตร 3 อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด 66.97±1.80 และ 7.68±0.58 กรัมต่อขวด ตามลำดับ อีกทั้งยังให้ผลผลิตร้อยละเฉลี่ยสูงสุด 14.40±0.82 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนในถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าอาหารสูตร 3 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ยสูงสุด 1,506.80±18.12 มิลลิกรัม /100 กรัม ในขณะที่สูตร 2 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 60 วัน มีปริมาณสารอะดีโนซีนเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 118.70±0.82 มิลลิกรัม /100 กรัม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการเก็บเกี่ยวถั่งเช่าสีทองคือ ที่อายุ 80 วัน ส่วนสูตรอาหารที่ให้สารคอร์ไดเซปินสูงที่สุดคือ สูตรข้าวสังข์หยดผสมกับดักแด้ปั่น และสูตรอาหารที่ให้สารอะดีโนซีนที่สูงคือ สูตรข้าวสังข์หยดผสมกับน้ำต้มมันฝรั่ง

คำสำคัญ: ถั่งเช่าสีทอง คอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน อายุการเก็บเกี่ยว ข้าวสังข์หยด

Abstract

The purpose of this study was to examine the effect of *Cordyceps militaris* mushroom's harvesting age and to compare the influence of different culture formulas that influences on cordycepin and adenosine concentrations when grown in a synthetic medium. Three formulas were employed to prepare the synthetic media: Sangyod rice (*Oryza sativa* L.) mixed with water (formula 1), Sangyod rice combined with potato aqueous extract (formula 2), and Sangyod rice blended with pupae (formula 3). Samples were harvested at 60, 70, 80, and 90 days. The experiment was arranged using a Randomized Complete Block Design (RCBD) with four replications (10 bottles/formula). The results revealed statistically significant differences ($p<0.05$) in cordycepin and adenosine concentrations. At 80 days of harvest, formula 3 provided the maximum average fresh and dry mushroom weight with 66.97±1.80 and 7.68±0.58 g/bottle, respectively, yielding 14.40±0.82%. Cordycepin and adenosine contents were analyzed using HPLC. It showed that formula 3 yielded the highest cordycepin amount (1,506.80±18.12 mg/100 g) at 80 days of harvest. At 60 days of harvest, formula 2 revealed the highest quantity of adenosine (118.70±0.82 mg/100 g). In conclusion, the ideal harvesting period for *C. militaris* was found to be 80 days, *O. sativa* mixed with blended pupae provided the highest cordycepin contents whereas *O. sativa* combinded with potato aqueous extract resulted in the highest adenosine levels.

Keywords: *Cordyceps militaris*, cordycepin, adenosine, harvesting age, Sangyod rice

[1] สาขานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา 90110
[2] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จ.ปทุมธานี 12120
[3] สถานีวิจัยและพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.ลพบุรี 15250
[1] Pest Management, Faculty of Natural Resourses, Prince of Songkla University, Songkla 90110
[2] Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Pathum Thani 12120
[3] Research Center (Pa-Niet), Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Lop Buri 15250
*corresponding author, E-mail: srihanant.n@gmail.com

คำนำ

ถั่งเช่าทิเบต *(Cordyceps sinensis)* หรือถั่งเช่าแท้ เป็นถั่งเช่าที่เก็บจากธรรมชาติบริเวณที่ราบสูง เจริญได้ดีในแถบเทือกเขาหิมาลัย มีสรรพคุณทางยา และมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แพทย์แผนจีนใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แต่เนื่องจากเห็ดถั่งเช่าชนิดนี้หาได้ยาก ต้องการอากาศเย็น จึงทำให้มีราคาที่สูงมาก (Holliday and Cleaver, 2008) แต่ยังพบว่ามีเห็ดถั่งเช่าอีกชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณทางยาสูง สามารถเพาะเลี้ยงและควบคุมสภาวะได้ มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกัน และไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค คือ ถั่งเช่าสีทอง *(Cordyceps militaris)* จัดอยู่ในสกุล *Cordyceps* เป็นเห็ดที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มเห็ดเป็นยา ในวงศ์ Clavicipitaceae ลักษณะเด่นของถั่งเช่าสีทอง จะมีสีเหลืองทองหรือสีเหลืองอมส้มไปจนถึงสีส้ม ถั่งเช่าสีทองจัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประโยชน์ มีส่วนประกอบของสารอาหาร วิตามิน เกลือแร่ และแร่ธาตุ โดยเห็ดถั่งเช่าสีทองนี้ ถือเป็นเห็ดตระกูลเดียวกับถั่งเช่าทิเบต แต่ต่างสายพันธุ์หรือสปีชีส์ สำหรับการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองในปัจจุบันนั้นมีอยู่ 2 รูปแบบคือ การเพาะด้วยหนอน และอาหารสังเคราะห์ (Winkler, 2008)

ถั่งเช่าสีทองสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ คือ สารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) และสารอะดีโนซีน (Adenosine) (Du et al., 2012; Wang et al., 2015) ซึ่งสารอะดีโนซีนมีคุณสมบัติช่วยต้านการแข็งตัวของเลือด ลดไขมันในเส้นเลือด ลดอาการเหนื่อยล้า และเพิ่มประสิทธิภาพในการไหลเวียนของเลือด (Chen et al., 2008; Das et al., 2010) ส่วนสารคอร์ไดเซปินช่วยปรับและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เสริมสร้างสมรรถนะทางเพศ และมีกลไกการออกฤทธิ์ของถั่งเช่านั้นมีหลายรูปแบบที่นำไปสู่การต่อต้านเซลล์มะเร็งที่ได้ผล เช่น การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง กระตุ้นกลไกการต่อต้านหรือทำลายสิ่งแปลกปลอม และการสังเคราะห์โปรตีนเช่นเดียวกับสารต้านอนุมูลอิสระ (Xiao and Zhong, 2007; Buenz et al., 2005; Zhou et al., 2009) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoshikawa et al. (2007) ได้ศึกษาศักยภาพของสารคอร์ไดเซปินจากถั่งเช่าในการยับยั้งเซลล์ตั้งต้นของมะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (promyelocytic leukaemia) (HL 60) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ อีกทั้งมีการศึกษาผลของคอร์ไดเซปินจากถั่งเช่าในการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ คือ MDA-MB-231 และ MCF-7 ผลปรากฏว่าสารคอร์ไดเซปิน สามารถทำลายเซลล์มะเร็งเต้านมทั้ง 2 ชนิด ได้เป็นอย่างดี (Choi et al., 2011) จึงทำให้ปัจจุบันถั่งเช่าสีทองได้รับความสนใจจากผู้บริโภคที่รักสุขภาพ เนื่องจากประโยชน์ที่หลากหลายทำให้ถั่งเช่าเป็นที่ต้องการในตลาด ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์ถั่งเช่าในหลากหลายรูปแบบ เช่น แคปซูลอาหารเสริม ถั่งเช่าผงซุป และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มถั่งเช่า เป็นต้น ถือว่าเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอีกชนิดของไทย ซึ่งการซื้อ - ขาย เห็ดถั่งเช่าสีทองจะอยู่ในรูปแบบอบแห้ง ราคาอยู่ที่ 15,000 บาท/กิโลกรัม และขายในระยะเส้นใยเพื่อนำไปผลิตยา โดยราคาขึ้นอยู่กับปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน ซึ่งปริมาณสารที่มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยประกอบกัน เช่น ระยะเวลาการเก็บผลผลิต อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และแสง เป็นต้น (Tapingka, 2012)

เนื่องจากถั่งเช่าสีทองเป็นที่ต้องการของตลาด ปัญหาของผู้ผลิต คือ ปริมาณสารสำคัญที่ไม่แน่นอนในแต่ละรอบการผลิต สาเหตุอาจเกิดได้หลายอย่าง เช่น ระยะเวลาการเก็บผลผลิต อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และแสง เป็นต้น เพื่อให้สามารถวางแผนการผลิตให้ผลิตผลมีความแน่นอนหรือสามารถคาดการณ์ปริมาณสารในแต่ละรอบการผลิตได้ ผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาสูตรอาหารสังเคราะห์โดยใช้ข้าวสังข์หยดเป็นอาหารเพาะหลัก และระยะเวลาเป็นจำนวนวันในการเก็บผลผลิตที่ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีนสูงสุด สามารถพัฒนาสูตรอาหารที่มีศักยภาพเพิ่มการเจริญเติบโตของเส้นใยถั่งเช่าสีทอง รวมถึงการลดต้นทุนการผลิต ก่อให้เกิดประโยชน์สำหรับผู้ประกอบการและผู้ที่สนใจเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

การแยกหัวเชื้อถั่งเช่าสีทองให้บริสุทธิ์บนอาหารวุ้น (Modified PDA)

เตรียมต้นถั่งเช่าสีทองที่เจริญเติบโตดีต้นมีลักษณะสูง ไม่แคระ สีส้มอมเหลือง ไม่อ่อนและไม่แก่จนเกินไป เหมาะสำหรับการคัดแยก นำใบมีด เข็มเขี่ยเชื้อ และปากคีบลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นนำปากคีบดึงถั่งเช่ามา 1 ต้น ตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของต้นถั่งเช่าออกเพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำส่วนตรงกลางของลำต้นมาวางลงในขวดอาหารแบน (Modified PDA) ระวังอย่าให้ชิ้นส่วนถั่งเช่าที่วางเคลื่อนที่ นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส บ่มจนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

การเตรียมหัวเชื้อถั่งเช่าในอาหารชนิดเหลว (Modified Broth)

ปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นเป็นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัม ต่อน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปล้างให้สะอาด นำไปต้มจนมันฝรั่งสุกนิ่ม กรองเฉพาะน้ำด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่น้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร ต้มจนละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน บรรจุสารลงใน Flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษหรืออลูมิเนียมฟอยล์ทับอีกครั้ง นำไปนึ่ง

ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 35 นาที เมื่ออาหารเหลวเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณรัศมีรอบนอกของเส้นใยบนจานอาหาร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ลงในขวดอาหารเหลว บ่มบน Shaker โดยบ่มแบบเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยเขย่า 3 ชั่วโมง พัก 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด เพื่อให้เส้นใยเจริญ

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังนี้

สูตรที่ 1 ข้าวสังข์หยดผสมน้ำเปล่า ตวงเมล็ดข้าวสังข์หยด 30 กรัม ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์ เติมน้ำสะอาดปริมาตร 75 มิลลิลิตร/ขวด

สูตรที่ 2 ข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง (มันฝรั่ง 200 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) เตรียมมันฝรั่งปอกเปลือกล้างให้สะอาด หั่นมันฝรั่งเป็นครึ่งวงกลมชิ้นละเท่าๆ กัน ปริมาณ 200 กรัม นำไปต้มในน้ำจนมันฝรั่งสุกนิ่ม จากนั้นกรองเอาเฉพาะน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ตวงเมล็ดข้าวสังข์หยด 30 กรัม ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์ เติมน้ำต้มมันฝรั่งปริมาตร 75 มิลลิลิตร/ขวด

สูตรที่ 3 ข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น (ดักแด้ 200 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) ชั่งดักแด้ 200 กรัม นำไปปั่นในเครื่องปั่นจนละเอียด นำดักแด้ที่ปั่นละเอียดผสมกับน้ำเปล่าปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ตวงเมล็ดข้าวสังข์หยด 30 กรัม ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์ เติมน้ำดักแด้ปั่น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร/ขวด

จากนั้นนำฝาขวดที่ปิดรูด้วยเทปมาปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที พักไว้ให้ขวดคลายความร้อนจนกระทั่งขวดเย็น เก็บเข้าห้องที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เพื่อลดการทำงานของจุลินทรีย์ระหว่างรอการฉีดเชื้อ

การถ่ายหัวเชื้อเหลวลงในอาหารเพาะเลี้ยง

เพื่อป้องกันการปนเปื้อนทำความสะอาดฝาขวดเพาะเลี้ยง และเข็มถ่ายเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ถ่ายหัวเชื้อเหลวด้วยเข็มถ่ายเชื้อลงในขวดอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อขวด จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 - 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ประมาณ 7 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร นำไปให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนซ์ ที่อุณหภูมิ 22 - 24 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกและเป็นดอกต่อไป

การเก็บเกี่ยวผลผลิต

เมื่อถั่งเช่าสีทองมีอายุครบ 60, 70, 80 และ 90 วัน ก่อนการเก็บเกี่ยวให้ทำความสะอาดอุปกรณ์และภาชนะ ฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เปิดฝาขวดเพาะเลี้ยงแล้วใช้ปากคีบดึงต้นถั่งเช่าออกมาวางทีละต้นวางบนภาชนะที่เตรียมไว้ โดยดึงบริเวณโคนต้นถั่งเช่าเพื่อให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ที่สุด เมื่อเก็บเสร็จนำถั่งเช่าไปชั่งน้ำหนักสดต่อหนึ่งขวดเพาะเลี้ยง และคำนวณผลผลิตร้อยละ (%Yield) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

แล้วนำไปผึ่งลมให้แห้งประมาณ 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปอบความร้อนที่ 48 องศาเซลเซียส หลังจากอบนำมาชั่งน้ำหนักแห้งและให้เก็บผลผลิตไว้ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพสุญญากาศ

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวิทยาศาสตร์เกษตรและเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรธรรมชาติและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เก็บข้อมูลจากการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์สารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน วางแผนการทดลองสุ่มแบบสมบูรณ์ในบล็อก (Randomized Complete Block Design, RCBD) ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ได้แก่อาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันจำนวน 3 สูตร และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ 60, 70, 80 และ 90 วัน ทำทั้งหมด 4 ซ้ำๆ ละ 10 ขวด นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS version 9.1 โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Duncan's New Multiple Range Test ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการแยกหัวเชื้อให้บริสุทธิ์และผลการเตรียมหัวเชื้อเหลว

ผลการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็ง (PDA) พบว่าเส้นใยมีลักษณะแผ่ออกเป็นวงกว้างจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเริ่มต้น มีลักษณะฟู หนาแน่น เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอมส้ม เส้นใยสามารถเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงใช้ระยะเวลาประมาณ

20 วัน (Figure 1 A) ส่วนผลการเตรียมหัวเชื้อเหลว (PDB) เมื่อนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของถั่งเช่าสีทองเจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งได้จากขั้นตอนการคัดแยกหัวเชื้อให้บริสุทธิ์เขี่ยลงไปในอาหารเหลว บ่มบน Shaker เขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด พบว่าเส้นใยสามารถเจริญเต็มในขวดอาหารเหลว มีลักษณะเป็นเกล็ดวุ้น สีขาวขุ่น (Figure 1 B) โดยทั่วไปการผลิตดอกเห็ดถั่งเช่าบนผิวหน้าอาหารเหลว และอาหารแข็งที่ใช้ธัญพืชเป็นวัสดุปลูกมี 3 ระยะ คือ ระยะการเจริญของเส้นใย ระยะการเกิดตาดอก (primordial initiation stage) และระยะการเจริญเป็นดอกเห็ด (Liang et al., 2014) โดยแต่ละระยะต้องการองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกันไป จากการเตรียมหัวเชื้อเห็ดถั่งเช่าบนอาหารเหลวที่ใช้ก่อนการนำไปถ่ายลงแต่ละชุดการทดลอง พบเส้นใยเจริญเต็มในขวดอาหารเหลวได้ดี โดยอาหารดังกล่าวมีแหล่งคาร์บอนได้แก่ มันฝรั่ง และน้ำตาลกลูโคส ส่วนแหล่งไนโตรเจน คือ เปปโตน และยีสต์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดรา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tongaram (2015) พบว่าการใช้อาหารเหลวที่มีส่วนผสม มันฝรั่ง ยีสต์สกัด เปปโตน และน้ำตาลกลูโคส เส้นใยมีการเจริญเติบโตเต็มอาหารเหลวใช้เวลาประมาณ 4.3 วัน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chioza and Ohga (2013) การเพิ่มเปปโตนสามารถเพิ่มผลผลิตของดอกเห็ดอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 0.325 กรัม น้ำตาลซูโคส 0.65 กรัม เปปโตน 2 กรัม และ corn steep liquor 65 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่ให้แสงเส้นใยเจริญดีที่สุด ในขณะที่ Lan et al. (2015) พบว่าการผลิตเส้นใยของ *Cordyceps sinensis* UM01 ในอาหารเหลวโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยมากที่สุด

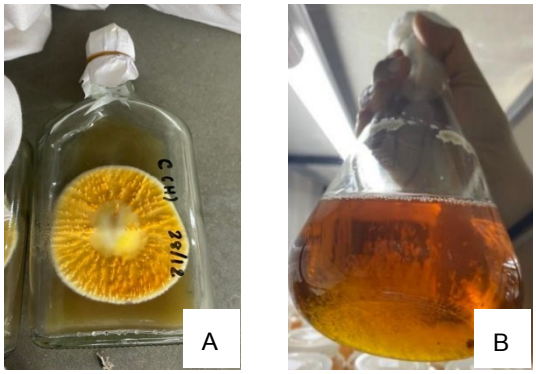

Figure 1 Mycelium growth of *C. militaris* on (A) solid medium (at day 20) and (B) submerge medium (at day 7)

ผลการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองภายหลังถ่ายหัวเชื้อเหลวลงในอาหารเพาะเลี้ยง 3 ชนิด

ผลจากการถ่ายหัวเชื้อเหลวลงในอาหารเพาะเลี้ยง และนำไปบ่มในที่มืดประมาณ 7 วัน พบว่าสูตรที่ 1 (ข้าวสังข์หยดผสมน้ำเปล่า) และสูตรที่ 2 (ข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง) เส้นใยสีขาว ฟู เจริญเต็มผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงได้ดีพอสมควร ในขณะที่อาหารสูตร 3 (ข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น) เส้นใยสีขาว ฟู มีความหนาแน่นของเส้นใยมากกว่า สามารถเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด (Figure 2 A, B และ C) ภายหลังจากให้แสงด้วยแสงฟลูออเรสเซนต์เพื่อกระตุ้นเส้นใยให้เป็นตุ่มดอก พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตร เส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอมส้มใช้ระยะเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง แต่ไม่เกิดก้านดอกเห็ด (fruiting body) ในขณะที่อาหารสูตรที่ 3 มีการเปลี่ยนสีของเส้นใยเห็นได้ชัดเจน เส้นใยสามารถพัฒนาเป็นตุ่มดอกได้เร็วที่สุดใช้ระยะเวลาเพียง 3 วัน (Figure 2 F) ในขณะที่ในสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ใช้ระยะเวลาประมาณ 4 วัน (Figure 2 D และ E) เนื่องจากอาหารสูตรที่ 3 มีส่วนประกอบของข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น ซึ่งอุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดอะมิโนสูง เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างเซลล์ และมีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเชื้อราชั้นสูง (Kim and Yun. 2005) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hong et al. (2010) ได้ฉีดเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองเข้าไปในดักแด้ไหม (*Bombyx mori*) พบว่าสามารถพัฒนาเกิดเป็นก้านดอกเห็ดได้สมบูรณ์ และผลการศึกษาของ Waraporn (2013) พบว่าการเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) บนดักแด้ไหมเกิดเป็นตุ่มดอก และตุ่มดอกสามารถพัฒนาเป็น stroma อีกทั้งงานวิจัยของ Sornprasert et al. (2016) ได้เพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองบนข้าวหอมนิลที่เติมอาหารเสริมผสมดักแด้ พบว่าให้จำนวนดอกหรือ stroma สูงสุด จากผลทดลองจึงสามารถกล่าวได้ว่าอาหารสูตร 3 มีส่วนประกอบของข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ไหมมีความเหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) โดยเส้นใยสามารถพัฒนาเป็นตุ่มดอกได้ดีที่สุด

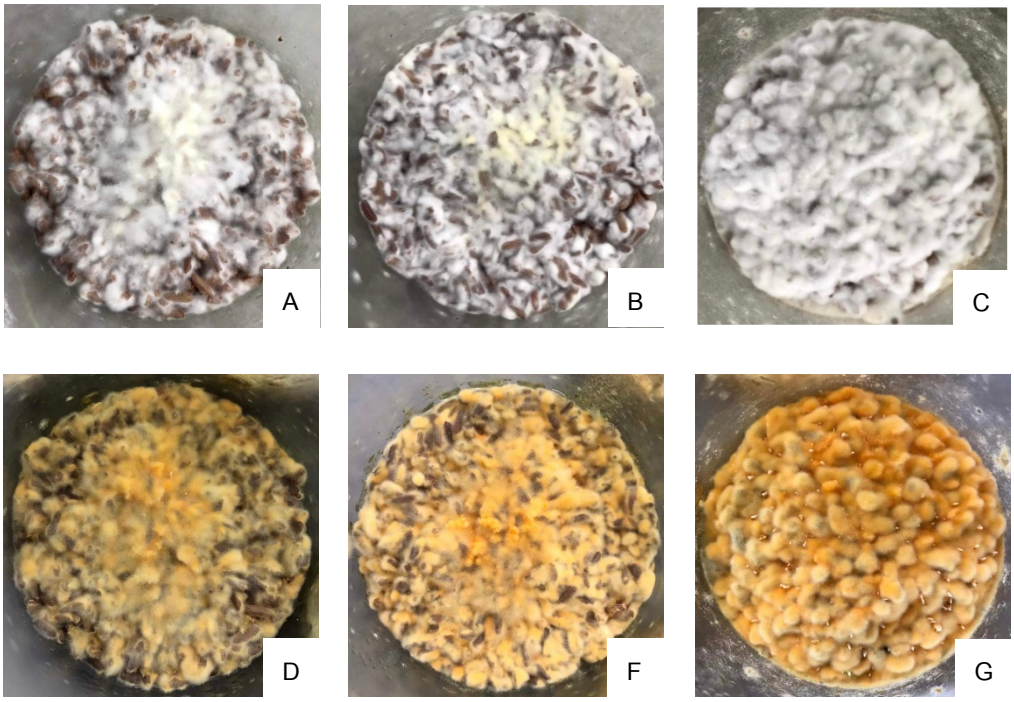

Figure 2 Morphology of *C. militaris* mycelium after 7 days in darkness (A, B, and C) and after aditional 3 days in light (D, E, and F). The meadia used were Sangyod rice with water (A, D), Sangyod rice with potato (B, F) and Sangyod rice with silk pupa (C, G).

ผลการเก็บเกี่ยวผลผลิตถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 3 ชนิด อายุ 60, 70, 80 และ 90 วัน

ผลการเก็บเกี่ยวถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร ที่อายุการเก็บเกี่ยว 60, 70, 80 และ 90 วัน (Figure 3) พบว่าทุกสูตรอาหารสามารถพัฒนาเป็นตุ่มดอกและพัฒนาต่อเป็น stroma รูปทรงกระบอก ลักษณะสีเหลืองอมส้ม หลังจากที่นำไปชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และคำนวณผลผลิตร้อยละ พบว่าสูตรอาหารมีผลต่อน้ำหนักสดของเห็ดถั่งเช่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.05$) โดยสูตรที่ 3 (ข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น) ให้ผลด้านน้ำหนักสดมากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้านน้ำหนักแห้ง และผลผลิตร้อยละ ในขณะที่ช่วงอายุการเก็บเกี่ยว พบว่าถั่งเช่าสีทองที่อายุ 80 วัน ให้ผลของน้ำหนักสดมากที่สุด 58.01±3.69 กรัมต่อขวด ในขณะที่อิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและช่วงอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อผลผลิตของถั่งเช่าสีทองแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.05$) พบว่าอาหารสูตรที่ 3 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งถั่งเช่าสีทองเฉลี่ยสูงสุด 66.98±1.80 และ 7.68±0.58 กรัมต่อขวด ตามลำดับ ในขณะที่สูตร 2 (ข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง) อายุการเก็บเกี่ยว 70 วัน ให้ผลผลิตด้านน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่ำที่สุด 43.21±2.63 และ 5.60±0.41 กรัมต่อขวด เมื่อนำมาคำนวณผลผลิตร้อยละของถั่งเช่าสีทอง พบว่าอาหารสูตร 3 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน มีค่าเฉลี่ยร้อยละสูงสุดเท่ากับ 14.40±0.82 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าถั่งเช่าสีทองสามารถเจริญได้บนอาหารดักแด้ไหม (*Bombyx mori*) อยู่ในอันดับ Lepidoptera ประกอบกับดักแด้ไหมอุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าหาได้ง่ายในท้องถิ่น และมีทุกฤดูกาล ดังนั้นอาหารสูตร 3 ที่มีส่วนประกอบของข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น ให้ผลด้านน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และผลผลิตร้อยละมากกว่าสูตรอื่น อันเนื่องมาจากดักแด้ไหมมีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น และกากใย มีปริมาณเท่ากับ 55.9, 13.7, 8.5, 12.5 และ 5.6 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่แมลงชนิดอื่นมีปริมาณน้อยกว่า (Aramwit et al., 2014) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khumsaensr et al. (2019) ได้ศึกษาผลของการใช้แมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง *C. militaris* หลังจากให้แสงครบ 5 สัปดาห์ พบว่าก้านดอกเห็ดจากกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม มีความสูงเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด และน้ำหนักมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mu et al. (2010) ทำการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองด้วยปลายข้าวไรซ์เบอร์รี่เติมอาหารเสริมผสมดักแด้ไหม พบว่ามีการพัฒนาของตุ่มดอกที่มีสีส้มเข้มและให้น้ำหนักดอกสดมากที่สุด

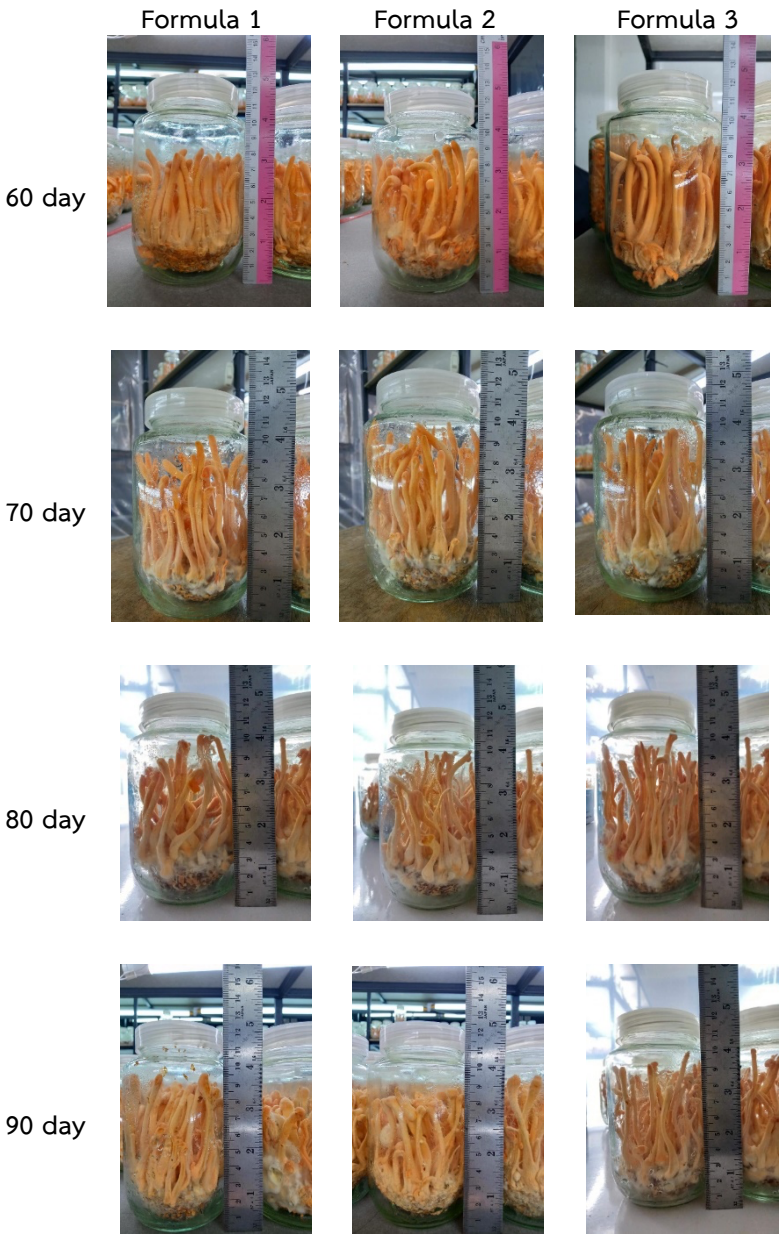

Figure 3 Fruiting bodies of *C. militaris* on different substrates, cultured for 60, 70, 80 and 90 days with exposure to light for the final 3 days.

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในถั่งเช่าสีทองที่อายุการเก็บเกี่ยว 60 70 80 และ 90 วัน

ผลการวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน 3 สูตร ที่อายุการเก็บเกี่ยว 60 70 80 และ 90 วัน พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างสูตรอาหารและช่วงอายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือสารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในสูตร 3 (ข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น) ที่อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,506.80 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งอาหารเพาะเลี้ยงสูตรที่ 3 ประกอบด้วยวัตถุดิบที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของถั่งเช่าสีทอง โดยเฉพาะข้าวสังข์หยดอุดมไปด้วย กากใย ธาตุเหล็ก และมีวิตามินสูง (Itharat et al., 2016) ส่วนดักแด้ไหมมีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และความชื้นสูงซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญของ fruiting body รวมถึงปริมาณผลผลิตและปริมาณสารคอร์ไดเซปิน (Aramwit et al., 2014) ในขณะที่อาหารสูตร 1 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 60 วัน มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินน้อยที่สุด 608.80 มิลลิกรัม/100 กรัม เนื่องจากมีส่วนประกอบเพียงข้าวสังข์หยดผสมน้ำเปล่า อีกทั้งยังเก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่สั้นกว่าทำให้การผลิตสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณต่ำกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Oh et al., (2019) รายงาน

ว่าถั่งเช่าสีทองเมื่อเก็บเกี่ยวที่ระยะที่ 1-3 หรืออายุ 2-4 สัปดาห์ พบชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์น้อยกว่าถั่งเช่าในระยะที่ 4 (10-11 สัปดาห์) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีน พบว่าอาหารสูตรที่ 2 (ข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง) ที่อายุ 60 วัน มีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดเท่ากับ 118.70 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมาคืออายุการเก็บเกี่ยวที่อายุ 80 วัน มีปริมาณสารอะดีโนซีนเท่ากับ 112.30±0.82 มิลลิกรัม/100 กรัม (Table 1) จะเห็นได้ว่านอกจากสูตรอาหารแล้ว อายุการเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิด โดยปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่ได้จากอาหารแต่ละสูตร เมื่ออายุมากขึ้นปริมาณสารจะเพิ่มขึ้นและพบปริมาณสูงสุดที่อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน จากนั้นจะลดลงเมื่ออายุการเก็บเกี่ยวที่ 90 วัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsieh et al. (2005) รายงานว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่สายพันธุ์เห็ด สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ความเป็นกรด-เบสของอาหาร สภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงและเก็บผลผลิต รวมถึงวิธีการวิเคราะห์สาร (Huang et al., 2009) ดังนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองที่ให้ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและที่ให้สารอะดีโนซีนสูงสุด คือ สูตรอาหารที่ใช้ข้าวสังข์หยดผสมกับดักแด้ปั่น (สูตที่ 3) และข้าวสังข์หยดผสมน้ำต้มมันฝรั่ง (สูตรที่ 2) และช่วงอายุที่ 80 วัน เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้ผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์สูง อีกทั้งทำให้ทราบระยะเวลา รอบการผลิตที่แน่นอนและเกิดประโยชน์ในกระบวนการผลิตต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตและปริมาณสารออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ แสง และช่วงอายุการเก็บเกี่ยว เป็นต้น จากการทดลองสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงและอายุการเก็บเกี่ยวถั่งเช่าสีทองที่เหมาะสมต่อปริมาณผลผลิต สารคอร์ไดเซปินและสารอะดีโนซีน คือ อาหารสูตรที่ 3 ที่มีส่วนประกอบของข้าวสังข์หยดผสมดักแด้ปั่น อายุการเก็บเกี่ยว 80 วัน ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงสุด 66.97±1.80 และ 7.68±0.58 กรัมต่อขวด ตามลำดับ อีกทั้งยังให้มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1,506.80±18.12 มิลลิกรัม /100 กรัม ในขณะที่สูตร 2 ที่อายุการเก็บเกี่ยว 60 วัน มีปริมาณสารอะดีโนซีนเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 118.70±0.82 มิลลิกรัม /100 กรัม ทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองให้ได้ผลผลิตและให้ปริมาณสารออกฤทธิ์สูงและมีคุณภาพ จากการเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเวลาที่เหมาะสม อีกทั้งสามารถลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงและส่งเสริมศักยภาพในการพัฒนาการเพาะถั่งเช่าสีทองในประเทศไทยต่อไป

Table 1 Effects of different formulations and harvest times on the production of fruiting bodies, cordycepin and adenosine in *C. militaris*

Factor		Fresh body (g/ bottle)	Dry body (g/ bottle)	Yields (%)	Cordycepin (mg/100 g)	Adenosine (mg/100 g)
Formula (A)						
Sangyod rice with water		57.55±3.65^{a}	6.20±0.87	11.02±0.69	806.28±93.01^{b}	58.20±6.25^{c}
Sangyod rice with potato		48.31±2.24^{b}	6.01±0.75	12.49±0.70	990.40±61.86^{ab}	90.98±16.29^{b}
Sangyod rice with silk pupa		57.58±2.82^{a}	6.72±0.94	11.73±1.01	1159.83±91.11^{a}	111.07±5.45^{a}
F-test		**	ns	ns	**	**
CV (%)		9.83	14.26	12.59	25.70	12.70
Harvest times (B)						
60 day		50.73±1.41^{b}	5.92±0.81	11.69±0.62	675.37±30.40^{c}	99.60±12.70
70 day		53.48±5.17^{ab}	6.16±0.83	11.85±0.63	863.51±71.14^{b}	86.37±12.94
80 day		58.01±3.69^{a}	6.85±0.94	11.96±1.13	1243.93±120.70^{a}	86.34±14.21
90 day		55.69±2.90^{ab}	6.31±0.79	11.48±1.02	1159.20±127.81^{a}	74.70±12.13
F-test		*	ns	ns	**	ns
CV (%)		12.02	14.21	13.79	17.90	27.57
Formula (A)	Harvest times (B)					
Sangyod rice with water	60 day	51.35±1.77^{e}	6.19±0.88^{ab}	12.05±0.82^{bcd}	608.80±18.89^{l}	68.80±0.83^{f}
	70 day	52.34±1.84^{de}	5.83±0.82^{b}	11.74±0.43^{cd}	690.01±17.10^{j}	56.10±0.82^{h}
	80 day	64.90±1.82^{b}	6.95±0.33^{ab}	10.45±1.07^{de}	995.30±12.47^{e}	53.30±0.82^{i}
	90 day	59.54±1.47^{c}	5.84±0.82^{b}	9.82±0.67^{e}	931.00±18.16^{h}	54.60±0.82^{hi}
Sangyod rice with potato	60 day	47.60±1.42^{f}	5.86±0.80^{b}	12.31±0.82^{bcd}	679.80±14.86^{k}	118.70±0.82^{a}
	70 day	43.21±2.63^{g}	5.60±0.41^{b}	12.96±0.57^{abc}	964.40±11.51^{f}	109.60±0.93^{c}
	80 day	53.73±1.82^{d}	5.92±0.82^{b}	11.02±0.80^{de}	1229.70±18.21^{c}	112.30±0.82^{b}
	90 day	48.69±1.90^{f}	6.65±0.44^{ab}	13.66±0.75^{ab}	1087.70±11.07^{d}	103.70±0.76^{d}
Sangyod rice with silk pupa	60 day	53.24±1.86^{de}	5.71±0.65^{b}	10.72±0.82^{de}	737.50±18.16^{i}	111.30±0.82^{bc}
	70 day	53.33±2.00^{de}	7.05±0.16^{ab}	10.86±0.90^{de}	936.10±13.68^{g}	93.40±0.81^{e}
	80 day	66.97±1.80^{a}	7.68±0.58^{a}	14.40±0.82^{a}	1506.80±18.12^{a}	93.42±0.84^{e}
	90 day	58.84±1.96^{c}	6.44±0.82^{ab}	10.95±0.80^{de}	1458.90±19.21^{b}	65.80±0.82^{g}
F-test		**	**	**	**	**
CV (%)		4.03	12.94	8.20	24.32	13.18

Mean in the same column, followed by the same latter are not significantly different by DMRT at P=0.05.
**,* Significant at 0.01and 0.05 probability levels, respectively. ,ns non-significant

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้เขียนขอประกาศว่าบทความนี้ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

ความคิดริเริ่ม: ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต. การปฏิบัติการวิจัย การมีส่วร่วมในการออกแบบการทดลอง วิธีการเก็บข้อมูล: ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต, ธนภักษ์ อินยอด. การจัดเก็บข้อมูล การวิเคราะห์ข้อมูลและการแปรผล: ธนภักษ์ อินยอด, ธนภัทร เติมอารมณ์, ชาตรี กอนี. การวิพากษ์วิจารณ์ผล: ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต. การมีส่วนร่วมในการเขียน: ณัฐพัชร์ ศรีหะนัลต, ธนภักษ์ อินยอด, ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์, ชาตรี กอนี. การให้การสนับสนุนเครื่องมือ และห้องปฏิบัติการ: ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ์.

เอกสารอ้างอิง

Aramwit, P., Bang, N., Ratanavaraporn, J., Nakpheng, T., & Teerapol, S. (2014). An anti-cancer cordycepin produced by *Cordyceps militaris* growing on the dead larva of *Bombyx mori* silkworm. **Journal of Agricultural Science**, 6(6), 41-53. (in Thai).

Buenz, E. J., Bauer, B. A., Osmundson, T. W., & Motley, T. J. (2005).The traditional chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. **Journal of Ethnopharmacology**, 96(1-2), 19-29.

Chen, X. M., Lu, J. X., Zhang, Y. D., He, J. T., Guo, X. Z., Tian, G. Y., & Jin, L. Q. (2008). Studies of macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from Paecilomyces tenuipes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 43(3), 252-256.

Choi, S., Lim, M. H., Kim, K. M., Jeon, B. H., Song, W. O., & Kim T. W. (2011). Cordycepin induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 257(2), 165-168.

Chioza, A., & Ohga, S. (2013). Mycelial growth of paecilomyces hepiali in various agar media and yield of fruit bodies in rice based media. **Advances in Microbiology**, 3(1), 529-536.

Du, L., Song, J., Wang, H., Li, P., Yang, Z., Meng, L., & Teng, L. (2012). Optimization of the fermentation medium for *Paecilomyces tenuipes* N45 using statistical approach. **African Journal of Microbiology Research**, 6(32), 6130-6141.

Das, S. K., Masuda, M., Sakurai, A., & Sakakibar, M. (2010). Medicinal use of the mushroom *Cordyceps militaris:* Current state and prospects. **Filtoterapia**, 81(8), 961-968.

Hong, I. P., Kang, P. D., Kim, K. Y., Nam, S. H., Lee, M. Y., Choi, Y. S., Kim, N. S., Kim, H. K., Lee, K. G. & Humber, R. A. (2010). Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. **Mycobiology**, 38(2), 128-132.

Holliday, J., & Cleaver, M. (2008). Medicinal value of caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycates). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 10(3), 219-234.

Hsieh, C., Tsai, M., Hsu, T., Chang, D., & Lo, C. (2005) Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 120(2), 145-157.

Huang, L., Li, Q., Chen, Y., Wang, X., & Zhou, X. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. **African Journal of Microbiology Research**, 3(12), 957-961.

Itharat, A., Uttama, S., & Makchuchit, S. (2016). Anti-inflammatory activities of constituents in sang yod rice extracts, **γ**-oryzanol, vitamins E, B1, B2 and B3, using inhibitory effects on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 murine macrophage cells. **Medicinal and Aromatic Plants**, 5(3), 1-6.

Khumsaensr, S., Kulsarin, J., Tapingkae, T., Buranapanichpan, S., & Kumpiro, S. (2019). Effects of edible insects as ingredient in sabouraud dextrose broth and culture media on growth of gold *Cordyceps*, *Cordyceps militaris* (L.) Link. **Journal of Agriculture**, 35(3), 365-374. (in Thai).

Kim, H. O., & Yun, J. W. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi Cordyceps militaris and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. **Journal of Applied Microbiology**, 99(4), 728-738.

Lan, Y. W., Kit, C. D., Lan, M. J., & Zhao, S. P. (2015). Fermentation optimization for the production of bioactive polysaccharides from *Cordyceps sinensis* fungus UM01. **International Journal of Biological Macromolecules**, 79(1), 180-185.

Liang, Z. C., Liang, C. H., & Wu, C. Y. (2014). Various grain substrates for the production of fruiting bodies and bioactive compounds of the medicinal caterpillar mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). **International Journal of Medical Sciences Mushrooms**, 16(6), 569-578.

Mu, X., Fa, J. C., Shuai, C., Yu, L. C., Xing, L., Jiao, L., Xue, H., & Hong, L. X. (2010). Effects of Light Hours on Growth and Development of *Cordyceps militaris*. **Journal of Hebei Agricultural Sciences**, 14(12), 160-170.

Oh, J., Yoon, D., Shrestha, B., Choi, H., & Sung, G. (2019). Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence process of *Cordyceps militaris* fruit bodies**. Journal of Microbiology**, 57(1), 54–63.

Sornprasert, R., Hambananda, A., & Aroonsrimorakot, S. (2016). Cultivation of *Cordyceps militaris* Using Differrent Cereal Geains and Local Insects and Inhibitory Efficiency Against *Trichophyton rubrum* and *Staphylococcus aureus*. **The Journal of King Mongkut's University of Technology North Bangkok**, 26(2), 239-251. (in Thai).

Tapingka, T. (2012). Cordyceps mushroom cultivation. **Kehakaset**, 36(4), 113-117.

Tongaram, Y. (2015). A comparative study of *Cordypeps militalis* (Tung Chao) culture from liquid and solid inoculation on growth medium mixed with thai millet. **CRMA Journal**, 13(1), 87-99. (in Thai).

Wang, J., Kan, L., Nie, S., Chen, H., Cui, S. W., & Phillips, A. O. (2015). A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. **Food Science and Technology**, 63(1), 2-7.

Waraporn, S. (2013). Development of culture media inducing stroma production of *Cordyceps sp.* **Khon Kaen Agriculture Journal**, 20(Suppl 1), 492-497. (in Thai).

Winkler, D. (2008). Yartsa gunbu (*Cordycepe sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, 6(1), 291-305.

Xiao, J. H., & Zhong, J. J. (2007). Secondary metabolites from Cordyceps species and their antitumor activity studies. **Recent Patents on Biotechnology**, 1(2), 123-137.

Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitoma, M. (2007). Cordycepin and *Cordyceps sinensis* reduce the growth of human promyelocytic leukaemia cells through the Wnt signalling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 34(1), 61-63.

Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. & Tang, K. (2009). Cordyceps fungi: Natural products, pharmacological functions and developmental products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 61(3), 279-291.