

ผลของการใช้สารเคลือบบางชนิดกับดักแด้ไหมต่อพัฒนาการและคุณภาพของ เห็ดถั่งห่าน *Cordyceps militaris* (L.) Link

Effects of Some Silkworm Pupa Coating Substances on Development and Quality of Gold Cordyceps, *Cordyceps militaris* (L.) Link

กิตติมา จินจรรยา¹ จิราพร กุลสาริน^{1*} ธัญญา ทะพิงค์แก² และ ไสว บุรณพานิชพันธุ์¹
Kittima Jeenjanya¹, Jiraporn Kulsarin^{1*}, Tanya Tapingkae² and Sawai Buranapanichpan¹

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ภาควิชาเทคโนโลยีและพัฒนาการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50300

²Department of Technology and Development in Agriculture, Faculty of Agricultural Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai 50300, Thailand

*Corresponding author: Email: j.tayuti@gmail.com

(Received: 11 November 2018; Accepted: 25 January 2019)

Abstract: Tibetan cordyceps, *Cordyceps sinensis* is an entomopathogenic fungus, which produces only one fruiting body from the tip of caterpillar. This characteristic is interesting to consumers. Therefore, us culture technique has been adapted to culture gold cordyceps, *Cordyceps militaris* (L.) Link, applying various coating substances to produce only one *C. militaris* fruiting body on a silkworm (*Bombyx mori* L.) pupa. *C. militaris* spore suspension was injected into the silkworm pupa at the head frontal area. The injected pupa was then coated with paraffin, PTFE and calcium alginate excepting the injection site for allowing the fungus grew through this site. The result revealed that injection of *C. militaris* at 10^6 spores/ml + pupa coated with PTFE + kept in dark condition yielded 99.50% of fruiting body when transferred to culture in light condition. It was obvious that this technique gave the highest growth and infection of the fungus on silkworm pupa. *C. militaris* fruiting body dried at 50 °C for 8 hours showed 948.32 mg/100 g of cordycepin contains by HPLC.

Keywords: *Cordyceps militaris*, silkworm pupa, coating substances, cordycepin

บทคัดย่อ: เห็ดถั่งเช่าทิเบต *Cordyceps sinensis* เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตโดยสร้างก้านดอกเห็ดหนึ่งก้านบนตัวหนอนผีเสื้อ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นที่น่าสนใจของผู้บริโภค จึงทำการพัฒนาเทคนิคการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link ด้วยการใช้สารเคลือบชนิดต่าง ๆ เพื่อทำให้เกิดก้านดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองหนึ่งก้านบนดักแด้ไหม (*Bombyx mori* L.) โดยทำการฉีดเชื้อรา *C. militaris* เข้าไปในตัวดักแด้ไหมตรงบริเวณส่วนหัว จากนั้นทำการเคลือบดักแด้ไหมด้วยพาราฟิล์ม, PTFE และแคลเซียมอัลจิเนต ยกเว้นตรงบริเวณที่ทำการฉีดเชื้อราเข้าไป เพื่อเป็นการปิดช่องทางการสร้างเส้นใยโดยควบคุมให้เส้นใยเกิดขึ้นเฉพาะภายในตัวดักแด้ไหม และเจริญออกมาบริเวณที่ไม่ได้เคลือบ จากการฉีดเชื้อรา *C. militaris* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร และเคลือบดักแด้ด้วย PTFE นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำออกมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง พบว่าสามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 99.50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเจริญเติบโตและความสามารถในการเข้าก่อโรคกับดักแด้ไหมสูงที่สุด และจากการวิเคราะห์สารคอร์โดซิปีนของเชื้อรา *C. militaris* ที่ผ่านการอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง พบสารคอร์โดซิปีนในก้านดอกเห็ดสูงสุดที่ 948.32 มิลลิกรัม/100 กรัม

คำสำคัญ: *Cordyceps militaris* ดักแด้ไหม สารเคลือบ คอร์โดซิปีน

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link เป็นเชื้อราก่อโรคกับแมลงที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และยังมีเชื้อราก่อโรคกับแมลงชนิดอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น เชื้อราขาว (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin) และ เชื้อราเขียว (*Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin) ที่มีการใช้เพื่อควบคุมแมลงศัตรูหลายชนิดทางการเกษตร (นิชานันท์ และวาสนา, 2561) สำหรับเชื้อรา *C. militaris* เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปบนภูเขาในหลายพื้นที่ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงสำหรับการผลิตก้านดอกเห็ด (fruiting body) ของเชื้อรานี้โดยใช้ธัญพืชหรือดักแด้ไหมเป็นวัสดุเพาะ ในประเทศจีนมีการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเลี้ยงไหม (*Bombyx mori* L.) และหนอนไหมอบแห้งมาเป็นส่วนผสมของอาหารปลุกเชื้อ *Cordyceps* ซึ่งในมณฑล Guangdong และมณฑล Liaoning ของประเทศจีน มีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นหลัก โดยคิดเป็นสัดส่วนมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด ปัจจุบันมีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองประมาณ 8,000 ตันต่อปี คิดเป็นเงินจำนวน 1.5 พันล้านหยวน แนวโน้มจะมีการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อจะช่วยเหลือยกระดับคุณภาพชีวิตความเป็นอยู่ของประชาชน โดยเฉพาะด้านการดูแลสุขภาพ

ส่งเสริมการเรียนรู้ให้เข้าใจอย่างลึกซึ้งในด้านการนำเห็ดถั่งเช่าสีทอง มาใช้ในทางการแพทย์ และสนับสนุนงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ทั้งในและต่างประเทศ ในปี ค.ศ. 2017 ที่ผ่านมา ปริมาณการใช้สมุนไพรจากธรรมชาติมีอัตราเพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปี และความต้องการยาสมุนไพรดั้งเดิมของจีน ไม่เพียงแต่เพิ่มขึ้นในประเทศจีนเท่านั้น แต่ยังมีการส่งออกไปยังประเทศแถบยุโรป ตะวันตกอีกด้วย (Cision PR Newswire, 2014) สำหรับประเทศไทยที่มีการปลูกเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้ดักแด้ไหมเป็นผลพลอยได้จำนวนมาก จึงมีการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Cordyceps* spp. บนดักแด้ไหมพันธุ์นางลาย×108 โดยการปลูกเชื้อให้กับดักแด้ไหม พบว่าเชื้อสามารถเจริญบนดักแด้ไหมได้ดี (สิริภักดิ์ และวันวิสาข์, 2552) เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ทางยาคล้ายกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต *C. sinensis* เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีทางการแพทย์แผนจีน คือช่วยปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ส่งเสริมการหลั่งของฮอร์โมนต่อมหมวกไต และควบคุมความดันโลหิต แต่เพราะความต้องการเห็ดถั่งเช่าสีทองจากเชื้อรา *C. militaris* ได้เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองในธรรมชาติมีราคาแพง และปัจจุบันการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองใช้เวลานาน (Hong et al., 2009) แต่เนื่องจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนดักแด้ไหมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการเลียนแบบ

ธรรมชาติ มีลักษณะการสร้างก้านดอกเห็ดบนดักแด่ใหม่ มากกว่าหนึ่งก้านต่อดักแด่ใหม่หนึ่งตัว จึงมีลักษณะแตกต่างจากเห็ดถั่งเจ้าที่เบตในธรรมชาติที่มีก้านดอกเห็ดเพียงหนึ่งก้านต่อแมลงหนึ่งตัว ทำให้ไม่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเท่าที่ควร ดังนั้นการทำให้เชื้อสามารถเจริญออกมาจากตัวแมลงเพียงก้านเดียวในลักษณะเหมือนกับที่พบในถั่งเจ้าที่เบต จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์และเพิ่มมูลค่าของเห็ดถั่งเจ้าเชิงอุตสาหกรรมในอนาคตได้ และด้วยปัจจุบันสารเคลือบหลายชนิดมีแนวโน้มสามารถยับยั้งการออกทะลุผ่านของเส้นใยเห็ดถั่งเจ้าได้ แต่เนื่องจากยังมีผลการศึกษาในการใช้กับเห็ดถั่งเจ้าน้อยมาก จึงได้ทำการศึกษาผลของสารเคลือบบางชนิดในการเคลือบดักแด่ใหม่ที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเจ้าสีทองขึ้น เพื่อควบคุมให้เส้นใยของเห็ดถั่งเจ้าเจริญงอกออกจากตัวดักแด่ใหม่เฉพาะจุดที่ไม่ได้เคลือบสารเท่านั้น ทำให้ได้ลักษณะของเห็ดถั่งเจ้าบนตัวแมลงที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติ และพัฒนาสู่การผลิตเชิงอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อรา *Cordyceps militaris*

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *C. militaris* สายพันธุ์ CMRU 1 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร potato dextrose agar (PDA) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15-20 วัน จะเห็นเส้นใย (mycelium) ของเชื้อรา *C. militaris* สีขาวอมเหลืองฟูขึ้นเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth (SDB) โดยเทอาหารเหลว SDB ลงในขวดปริมาณ 150 มิลลิลิตรต่อขวด และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ทิ้งไว้รอให้เย็น จากนั้นนำเชื้อรา *C. militaris* มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 5 มิลลิเมตร ใช้เข็มเย็บเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มชิ้นลงในใส่ลงในอาหารเหลว SDB จำนวน 6 ชิ้นต่อขวด ปิดจุกขวดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยกระดาษ จากนั้นนำไปเขย่าในที่มืดด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

ที่อุณหภูมิ 17-22 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงลงดักแด่ใหม่

2. การศึกษาการขึ้นดอกเห็ดถั่งเจ้าสีทองด้วยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเจ้าสีทอง

ศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเจ้าสีทองบนดักแด่ใหม่ *B. mori* พันธุ์ J108 x นางลายสระบุรี โดยใช้การเคลือบทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ 1) พาราฟิล์ม (parafilm) 2) polytetrafluoroethylene (PTFE) และ 3) แคลเซียมอัลจิเนต ($C_{18}H_{24}CaO_{19}$) เปรียบเทียบกับ 4) การไม่มีสารเคลือบใด ๆ บนดักแด่ใหม่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* บนดักแด่ใหม่โดยใช้เข็มฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดเชื้อรา *C. militaris* ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของดักแด่ใหม่ตรงบริเวณส่วนหัวซึ่งเรียกว่า frontal area จากนั้นแยกดักแด่ใหม่ที่ฉีดเชื้อใส่กล่องเพาะเลี้ยงปิดฝาให้สนิทนำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-90 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืด เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตเต็มที่ภายในตัวดักแด่ใหม่ นำออกมาเคลือบด้วยพาราฟิล์ม และ PTFE ยกเว้นบริเวณส่วนหัวของดักแด่ใหม่ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ฉีดเชื้อเข้าไป ในส่วนของการเคลือบด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ต้องทำการฉีดดักแด่ก่อนจากนั้นเคลือบด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอัตราส่วนผสมของสารโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมกับ แคลเซียม คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (Remawi, 2012) และดักแด่ใหม่ที่ไม่ผ่านการเคลือบเป็นชุดควบคุม แยกดักแด่ใหม่ที่ฉีดเชื้อใส่กล่องเพาะเลี้ยงปิดฝาให้สนิทนำไปบ่มไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-90 เปอร์เซ็นต์ บ่มในที่มืดที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 การบ่มในที่มืด 7 วัน ชุดการทดลองที่ 2 การบ่มในที่มืด 10 และชุดการทดลองที่ 3 การบ่มในที่มืดตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน เมื่อเกิดเป็นเส้นใย จึงนำออกมาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีแสงสว่างจากหลอดไฟ ซึ่งมีความเข้มแสง 100-1000 ลักซ์ (Hong et al., 2010) เพื่อให้เกิดการสร้างก้านดอกเห็ด (fruiting body) จากนั้นทำการบันทึกผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* การผลิตก้านดอกเห็ด

อัตราการติดเชื้อ อัตราการเกิดก้านดอกเห็ด ความยาวของก้านดอกเห็ด และจำนวนก้านดอกเห็ดต่อดักแด่หนึ่งตัว

3. การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบเห็ดถึงเจ้าสีทองบนดักแด่ไหมที่เคลือบด้วยสารเคลือบชนิดต่างๆ และบ่มเชื้อในเวลาที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารคอร์ไดซิปีน

ทำการอบเห็ดถึงเจ้าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนดักแด่ไหมในตู้อบลมร้อน (hot air oven) วัดน้ำหนักก่อนอบ หลังอบ เปรียบเทียบน้ำหนักที่หายไป จากนั้นวิเคราะห์หาสารคอร์ไดซิปีน โดยใช้เครื่อง HPLC5-UV VIS Detector (Shimadzu SPD-10A) (high performance liquid chromatography) ตามวิธีการของ Huang *et al.* (2009) และวางแผนแบบ 2x4x3 factorial experiment in CRD จำนวน 4 ซ้ำ 3 ปัจจัย ประกอบด้วย ปัจจัยที่ 1) อุณหภูมิและระยะเวลาในการอบถึงเจ้าสีทองบนดักแด่ไหม 2 ระดับคือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปัจจัยที่ 2) สารชนิดต่างๆ ที่ใช้เคลือบดักแด่ไหม และไม่เคลือบรวม 4 แบบ และปัจจัยที่ 3) ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ *C. militaris* ในที่มีด 3 ระยะ เป็นเวลา 7, 10 และ 14 วัน นำข้อมูลเปรียบเทียบผลทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียมเชื้อรา *C. militaris*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* สายพันธุ์ CMRU1 บนอาหารวุ้นสูตร PDA หลังเพาะเลี้ยงเชื้อรา 7-14 วัน จะเห็นเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น จากนั้นเส้นใยขยายวงกว้างขึ้นเรื่อยๆ จนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเริ่ม

เปลี่ยนสีเป็นสีขาวอมเหลือง ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยประมาณ 21 วัน จึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว SDB เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อรา พบว่าในสัปดาห์แรก มีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว เมื่อผ่านไป 3 สัปดาห์อาหารเหลวเริ่มข้นขึ้น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จึงสามารถนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงลงบนดักแด่ไหมได้

2. การศึกษาการเคลือบดักแด่ไหมด้วยสารชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถึงเจ้าสีทอง

จากการเคลือบด้วยพาราฟิล์ม, PTFE และแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* บนดักแด่ไหม พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 การบ่มในที่มีด 7 วัน จึงนำออกมาให้แสงสว่าง (ภาพที่ 1) ในทุกกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อดักแด่ไหมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ กรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด่ด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ ส่วนกรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด่ด้วย PTFE และชุดควบคุมที่ไม่มีการเคลือบดักแด่ไหม สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 98.50 เปอร์เซ็นต์ โดยการเคลือบดักแด่ด้วย PTFE มีจำนวนก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด่หนึ่งตัว และความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด 1.03 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมที่ไม่มีการเคลือบดักแด่ไหม มีจำนวนก้านดอกเห็ด 2.00 ก้านต่อดักแด่หนึ่งตัว ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด 1.49 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

ในชุดการทดลองที่ 2 บ่มในที่มีด 10 วัน จึงนำออกมาให้แสง (ภาพที่ 2) ในทุกกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อดักแด่ไหมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด่ไหมด้วยพาราฟิล์ม



Figure 1. Characteristics of injected silkworm pupae after coating with different substances for 7 days in dark and then light conditions: parafilm (a), PTFE (b), $C_{18}H_{24}CaO_{19}$ (c) and control (d)

Table 1. Infection and fruiting body formation percentage of *Cordyceps militaris* cultured on silkworm pupae coating with different substances after 7 days

Coating substance	Infection rate (%)	Fruiting body formation (%)	No. of fruiting body/pupa	Length of fruiting body (cm)
Parafilm	100	0.00	0.00	0.00
PTFE	100	98.50	1.00	1.03
C ₁₈ H ₂₄ CaO ₁₉	100	0.00	0.00	0.00
Control	100	98.50	2.00	1.49

และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ ในขณะที่การเคลือบดักแด้ใหม่ด้วย PTFE สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด้หนึ่งตัว และความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดคือ 0.95 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมของการเคลือบดักแด้แต่ละชนิดสามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 97.50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนก้านดอกเห็ด 2.00 ก้านต่อดักแด้หนึ่งตัว ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด 1.19 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ในชุดการทดลองที่ 3 บ่มในที่มืด 14 วัน จึงนำออกมาให้แสง ในทุกกรรมวิธีมีการเจริญเติบโตและสามารถเข้าก่อกอโรคกับดักแด้ใหม่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดก้านดอกเห็ดของกรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด้ด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่เกิดก้านดอกเห็ด ในขณะที่กรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วย PTFE สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 99.50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด้ใหม่หนึ่งตัว ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด 1.30 เซนติเมตร (ภาพที่ 3) และชุดควบคุมของการเคลือบดักแด้แต่ละชนิดสามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 97.00 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนก้านดอกเห็ด 2 ก้านต่อดักแด้หนึ่งตัว ความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ด 0.94 เซนติเมตร (ตารางที่ 3)

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้ง 3 ชุดการทดลอง กรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ เนื่องจากการเคลือบดักแด้ด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ทำให้ออกซิเจนไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังตัวดักแด้ใหม่ได้ จึงมีเพียงเส้นใยคลุ้มตัวดักแด้ใหม่เท่านั้น แต่กรรมวิธีที่มีการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วย PTFE

สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ เนื่องจาก PTFE มีคุณสมบัติในการซึมผ่านของออกซิเจนได้ดี จึงทำให้ผลการทดลองในชุดการทดลองที่ 3 ให้ผลดีที่สุดคือ สามารถเกิดก้านดอกเห็ดได้ 99.50 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด้ใหม่หนึ่งตัว และความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดคือ 1.30 เซนติเมตร ซึ่งความยาวเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดในชุดการทดลองนี้มีความยาวมากที่สุด จากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วย PTFE สามารถบังคับให้เชื้อรา *C. militaris* สร้างก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด้หนึ่งตัวได้ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการเกิดก้านดอกเห็ดของเชื้อรา *C. sinensis* ที่มีก้านดอกเห็ดเกิดขึ้นบนตัวหนอนเพียงหนึ่งก้านเท่านั้น

3. การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบเห็ดถั่งเจ้าสีทองบนดักแด้ใหม่ที่เคลือบด้วยสารเคลือบชนิดต่าง ๆ และบ่มเชื้อในเวลาที่ต่างกันต่อปริมาณสารคอร์โดซิปีน

หลังจากทำการอบเห็ดถั่งเจ้าบนดักแด้ใหม่ที่ผ่านการเคลือบด้วยพาราฟิล์ม, PTFE แคลเซียมอัลจิเนต และไม่มีการเคลือบ ที่บ่มไว้ในที่มืด 7, 10 และ 14 วัน โดยใช้ตู้อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาสารคอร์โดซิปีนในก้านดอกเห็ด ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่พบสารคอร์โดซิปีนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเคลือบดักแด้ใหม่ด้วย PTFE ที่มีปริมาณสารคอร์โดซิปีนเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มเชื้อไว้ในที่มืด โดยการบ่มในที่มืด 14 วัน และอบด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา

Table 2. Infection and fruiting body formation percentage of *Cordyceps militaris* cultured on silkworm pupae with different coating substances after 10 days

Coating substance	Infection rate (%)	Fruiting body formation (%)	No. of fruiting body/pupa	Length of fruiting body (cm)
Parafilm	100	0.00	0.00	0.00
PTFE	100	100	1.00	0.95
C ₁₈ H ₂₄ CaO ₁₉	100	0.00	0.00	0.00
Control	100	97.50	2.00	1.19

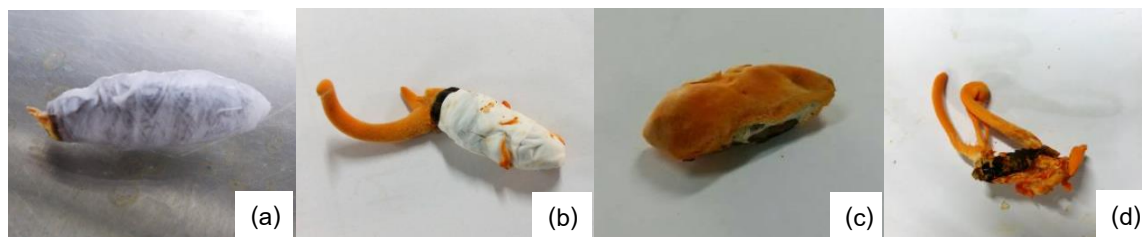


Figure 3. Characteristics of injected silkworm pupa after coating with different substances for 14 days dark and then light conditions: parafilm (a), PTFE (b), C₁₈H₂₄CaO₁₉ (c) and control (d)

Table 3. Infection and fruiting body formation percentage of *Cordyceps militaris* cultured on silkworm pupae with different coating substances after 14 days

Coating substance	Infection rate (%)	Fruiting body formation (%)	No. of fruiting body/pupa	Length of fruiting body (cm)
Parafilm	100	0.00	0.00	0.00
PTFE	100	99.50	1.00	1.30
C ₁₈ H ₂₄ CaO ₁₉	100	0.00	0.00	0.00
Control	100	97.00	2.00	0.94

8 ชั่วโมง พบปริมาณสารคอร์ไดซิปีนในก้านดอกเห็ดสูงสุด คือ 948.32 มิลลิกรัม/100 กรัม (ตารางที่ 4) ซึ่งการบ่มเชื้อไว้ในที่มีดักกล่าวไม่ส่งผลต่อน้ำหนักของก้านดอกเห็ด และดักแด่ใหม่ และให้ปริมาณสารคอร์ไดซิปีนมากกว่า การศึกษาของ กนกวรรณ และคณะ (2559) ที่รายงานว่า การฉีดเชื้อ CMRU1 (*C. militaris*) บนดักแด่ใหม่พันธุ์นางลาย และบ่มไว้ในที่มีดัก 7 วัน พบสารคอร์ไดซิปีนในก้านดอกเห็ดปริมาณ 130.34 มิลลิกรัม/100 กรัม

ดังนั้นการใช้ PTFE สามารถนำมาใช้เคลือบ ดักแด่ใหม่เพื่อชักนำให้เชื้อรา *C. militaris* สร้างก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด่ใหม่หนึ่งตัวได้ และจากการศึกษาของ Xu *et al.* (2003) พบว่า PTFE มีคุณสมบัติในการซึมผ่าน

ของออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แต่การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ พบว่า การบ่มเชื้อรา *C. militaris* ไว้ในที่มีดักในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณของสาร cordycepin ในก้านดอกเห็ด ที่มีปริมาณสารคอร์ไดซิปีนเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มเชื้อไว้ในที่มีดัก กล่าวคือยิ่งบ่มเชื้อไว้ในที่มีดักนาน สารคอร์ไดซิปีนจะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ในส่วนของการอบแห้งถึงเข้าสู่ห้อง การใช้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง ให้ปริมาณสารคอร์ไดซิปีน มากกว่าการอบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table 4. Content of cordycepin in fruiting body of *Cordyceps militaris* cultured on silkworm pupae with different coating substances incubate in dark conditions for 7, 10 and 14 days

Coating substance	Content of Cordycepin (mg/100g)					
	50 °C for 8 hrs			60 °C for 4 hrs		
	7 days	10 days	14 days	7 days	10 days	14 days
Parafilm	0.00 k ¹	0.00 k	0.00 k	0.00 k	0.00 k	0.00 k
PTFE	204.86 i	495.58 f	948.32 a	313.60 h	613.53 c	694.96 b
C ₁₈ H ₂₄ CaO ₁₉	0.00 k	0.00 k	0.00 k	0.00 k	0.00 k	0.00 k
Control	145.23 j	310.29 h	358.57 g	257.63 g	568.59 d	546.26 e

¹ Means within the same column and row followed by the same letter are not significantly different 95% level by LSD

สรุป

การใช้สารเคลือบ PTFE บนตัวดักแด้ใหม่สามารถบังคับให้เชื้อรา *C. militaris* ที่ความเข้มข้น 10⁶ สปอร์/มิลลิลิตร เจริญเติบโต และเข้าก่อโรคกับดักแด้ใหม่ได้สูงที่สุด ซึ่งการบ่มในที่มืดตลอด 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 14 วัน จึงนำออกมาให้แสง สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ 99.50 เปอร์เซ็นต์ และมีก้านดอกเห็ด 1 ก้านต่อดักแด้ใหม่หนึ่งตัวเหมือนกับเห็ดถั่งเช่าทิเบต (*C. sinensis*) โดยมีความยาวของก้านดอกเห็ด เท่ากับ 1.30 เซนติเมตร ซึ่งเมื่ออบก้านดอกเห็ดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 8 ชั่วโมง พบสารคอร์ไดซิปีน 948.32 มิลลิกรัม/100 กรัม และพบว่าการบ่มเชื้อรา *C. militaris* หลังจากฉีดเชื้อไว้ที่มี 7, 10 และ 14 วัน มีผลต่อปริมาณของสารออกฤทธิ์ โดยจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการบ่มเชื้อไว้ที่มี แต่การเคลือบด้วยพาราฟิล์ม และแคลเซียมอัลจิเนต ไม่สามารถทำให้เชื้อราสร้างก้านดอกเห็ดได้ ในขณะที่การไม่เคลือบดักแด้ใหม่ด้วยสารใดๆ เชื้อรายังคงสร้างก้านดอกเห็ด 2 ก้านต่อดักแด้ใหม่หนึ่งตัว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ เชียงใหม่ กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนดักแด้ใหม่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ัญญา ทะพิงค์แก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเชื้อรา

Cordyceps militaris (CMRU1) ในการทำงานวิจัย และทุนสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- กนกวรรณ ลือดารา จิราพร กุลสาริน ไสว บุรณพานิชพันธุ์ และ ัญญา ทะพิงค์แก. 2559. การเจริญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) บนดักแด้ใหม่ไทยพื้นบ้านพันธุ์นางลายและไหมป่าอีรี่. วารสารเกษตร 32(1): 95-102.
- ณิชาพันธ์ เกินอาษา และ วาสนา หวานชื่น. 2561. ความรุนแรงของเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* และเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero และเพลี้ยแป้งน้อยหน้า *Planococcus lilacinus* (Cockerell). วารสารเกษตร 34(3): 461-467.
- สิริภค สุระพร และ วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์. 2552. การเจริญของเชื้อรา *Cordyceps* spp. บนดักแด้ใหม่พันธุ์นางลาย × 108. วิทยาศาสตร์กำแพงแสน 7(1): 1-9.
- Cision PR Newswire. 2014. Research and investment prospect of China *Cordyceps militaris* market, 2013-2017. (Online) . Available: <https://www.prnewswire.com/news-releases/research-and-investment-prospect-of->

- china-cordyceps-militaris-market-2013-2017-255150541.html (October 30, 2017).
- Hiroki, S. and S. Mitsuaki. 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. Applied Entomology and Zoology 37(1): 85-92.
- Hong, I.P., S.H. Nam, G.B. Sung, K.G. Lee, S.M. Cho, S.J. Seok, H. Hur, M.W. Lee and S.X. Guo. 2009. Chemical composition of main *Cordyceps* species in Korea. International Journal of Industrial Entomology 18(1): 13-17.
- Hong, I.P., 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. 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. Mycobiology 38(2): 128-132.
- Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zhou. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12): 957-961.
- Remawi, M.A. 2012. Sucrose as a crosslinking modifier for the preparation of calcium alginate films via external gelation. Journal of Applied Sciences 12(8): 727-735.
- Xu, H., Z. Hu, S. Wu and Y. Chen. 2003. Surface modification of polytetrafluoroethylene by microwave plasma treatment of H₂O/Ar mixture at low pressure. Materials Chemistry and Physics 80(1): 278-282.
-