

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญของกลุ่มเส้นใย และการผลิต
เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในถั่งเช่าสีทองที่คัดเลือกจากฟาร์มต่าง ๆ
ในภาคกลางของประเทศไทย

Study of Morphology, Mycelial Growth and Exopolysaccharides
Production of *Cordyceps* sp. Selected from Several Farms
in Central Region of Thailand

สามารถ ต่ายขาว^{1*}, กัญญา กอแก้ว², ดวงหทัย รัตนสังขธรรม² และ สุนทรา เฟื่องฟุ้ง¹
Samart Taikhao^{1*}, Kanya Kokaew², Doungthai Rattanasatchatham² and Suntara Fueangfung¹

Received: 18 May 2022, Revised: 31 May 2023, Accepted: 4 September 2023

บทคัดย่อ

ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นราปรสิตในแมลงที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณสูง เช่น คอไรโบเซพิน อะดีโนซีน และโพลีแซ็กคาไรด์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การเจริญของกลุ่มเส้นใย ปริมาณชีวมวล และการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ใน *Cordyceps* sp. ที่ได้คัดเลือก จากฟาร์มต่าง ๆ ในภาคกลางของประเทศไทย โดยมีตัวอย่างของ *Cordyceps* sp. 11 ตัวอย่างที่คัดเลือกได้จากฟาร์มต่าง ๆ 6 ฟาร์ม ได้แก่ ไอโซเลท CM-Sp01 CM-Sp02 CM-Sp03 CM-Sp04 CM-Sp05 CM-Sp06 CM-Sp07 CM-Sp08 CM-Sp09 CM-Sp10 และ CM-Sp11 โดยทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยด้วยเทคนิค Slide culture และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทุกไอโซเลทมีลักษณะเส้นใยแบบมีผนังกั้น มีโคนเดี่ยวรูปทรงกลม และรูปทรงรี อยู่บริเวณปลายของเส้นใย อย่างไรก็ตาม ขนาดของโคนเดี่ยวมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลทของ *Cordyceps* sp. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและความหนาแน่นของโคโลนีของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ผลการทดลองพบว่า Vegetative

¹ หลักสูตรนวัตกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ อำเภอมืองนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี 11000

¹ Biotechnology Innovation Program, Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Mueang Nonthaburi, Nonthaburi 11000, Thailand.

² หลักสูตรจุลชีววิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000

² Microbiology Program, Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Phra Nakhon Si Ayutthaya 13000, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): samart.ta@rmutsb.ac.th Tel: 08 6615 0054

และ Aerial mycelium ในทุกไอโซเลตเป็นสีขาว ไอโซเลต CM-Sp02 มีความหนาแน่นของกลุ่มเส้นใยมากที่สุด การศึกษาการ เจริญของกลุ่มเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า ไอโซเลต CM-Sp08 มีอัตราการเจริญสูงสุด (5.06 ± 0.65 มิลลิเมตรต่อวัน) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกว้างที่สุด (66.12 ± 1.45 มิลลิเมตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มืด การศึกษา ปริมาณชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB พบว่าไอโซเลต CM-Sp08 มีการผลิต ชีวมวลสูงที่สุด (55.20 ± 1.65 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (2.86 ± 0.05 กรัมต่อลิตร) หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มืด แสดงให้เห็นว่าไอโซเลต CM-Sp08 มีศักยภาพสูงในการเจริญ การผลิตชีวมวล และการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

คำสำคัญ: ถังเช่าสีทอง, การเจริญของกลุ่มเส้นใย, ลักษณะพื้นฐานวิทยาของกลุ่มเส้นใย

ABSTRACT

Cordyceps militaris is an entomopathogenic fungus that can produce high levels of bioactive compounds such as cordycepin, adenosine, and polysaccharides. This research aimed to study mycelial morphology, growth, biomass, and exopolysaccharides production of *Cordyceps* sp. strains selected from several farms in central Thailand. Eleven samples of *Cordyceps* sp. were selected from six farms in Thailand. They were isolates CM-Sp01, CM-Sp02, CM-Sp03, CM-Sp04, CM-Sp05, CM-Sp06, CM-Sp07, CM-Sp08, CM-Sp09, CM-Sp10 and CM-Sp11. The hyphae morphology using the slide culture technique and microscopic examination were investigated. The results revealed that all isolates had septate hyphae. A round and an oval shape of conidia at the end of hyphae were also found. However, the size of conidia was different between *Cordyceps* sp. isolates. In addition, the study of morphology and density of mycelial colony of *C. militaris* isolates on PDA medium were determined. The results found that vegetative and aerial mycelium in all isolates were white. The isolate CM-Sp02 showed the highest mycelium density. Under determining the growth of mycelial colony by measuring colony diameter on PDA medium, isolate CM-Sp08 showed the highest growth rate (5.06 ± 0.65 mm/day) and length of diameter of mycelial colony (66.12 ± 1.45 mm) after 21 days of cultivation in PDA medium under temperature of 22 °C in dark condition. Mycelial biomass and exopolysaccharides in PDB medium were investigated. The result found that isolate CM-Sp08 showed the highest biomass production (55.20 ± 1.65 g/L) and the highest exopolysaccharide content (2.86 ± 0.05 g/L). This indicated that the isolate CM-Sp08 had high potential for growth, biomass production, and exopolysaccharide production.

Key words: *Cordyceps* sp., mycelial growth, mycelial morphology

บทนำ

ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทฟังไจที่เป็นปรสิตของแมลง (Entomopathogenic fungus) โดยในธรรมชาติ *C. militaris* สามารถเจริญได้ในตัวอ่อนของแมลงในอันดับ Lepidoptera และกระจายตัวในภูมิอากาศแบบอบอุ่นทั่วโลก (Chen *et al.*, 2020a) จัดอยู่ในจันีส Cordyceps วงศ์ Clavicipitaceae อันดับ Hypocreales ชั้น Ascomycetes และ ไฟลัม Ascomycota (Lee *et al.*, 2013a) ซึ่งจันีสนี้มีจำนวนมากกว่า 350 สายพันธุ์ทั่วโลก (Soltani *et al.*, 2015) เมื่อเปรียบเทียบกับถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis* ชื่อเดิม *Cordyceps sinensis*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในจันีสเดียวกันและได้รับความนิยมในการนำมาใช้ทางเภสัชวิทยาและทางการค้า พบว่า *C. militaris* เพาะเลี้ยงง่ายกว่า (Wu *et al.*, 2020) มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญบางชนิดมากกว่า (Soltani *et al.*, 2015) และมีราคาทางการค้าที่ถูกกว่า *O. sinensis* (Yin *et al.*, 2018) ส่งผลให้ในปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยง *C. militaris* เพื่อนำมาใช้กับงานทางด้านเภสัชวิทยาและทางการค้ามากยิ่งขึ้น (Wang *et al.*, 2017)

ได้มีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน *C. militaris* ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น คอรัโดเซปิน โพลีแซคคาไรด์ กรดออกซาลิก แคลโรทีนอยด์ และเพนโตสเตดิน (Xia *et al.*, 2017; Nurmamat *et al.*, 2018; Kunhorm *et al.*, 2019; Lou *et al.*, 2019a; Chen *et al.*, 2020b) โดยสารหลักสำคัญใน *C. militaris* คือ คอรัโดเซปิน ซึ่งเป็นการศึกษาแล้วว่าสามารถรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ RNA ที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งได้ (Lee *et al.*, 2013b) โดยสารคอรัโดเซปินจะมีปริมาณสูงในโครงสร้างของดอก (Stroma) มากกว่าในโครงสร้างของกลุ่มเส้นใย (Mycelium) ที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นดอก (Ha *et al.*, 2022) แต่อย่างไรก็ตาม

ในโครงสร้างของกลุ่มเส้นใยของ *C. militaris* อุดมไปด้วยแร่ธาตุ วิตามิน กรดอะมิโน และเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณมาก (Ha *et al.*, 2022) โดยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ใน *C. militaris* เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น มีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านการเกิดเนื้องอก ต่อต้านการอักเสบ และช่วยลดปริมาณไขมันในเลือดได้ (Wang *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความสนใจที่จะเพาะเลี้ยง *C. militaris* เพื่อจะผลิตกลุ่มของเส้นใยให้ได้ในปริมาณมาก โดยมีการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว เพื่อนำกลุ่มของเส้นใยดังกล่าวไปสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ในประเทศไทยเริ่มมีการเพาะเลี้ยง *C. militaris* กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการนำเข้าแม่พันธุ์จากต่างประเทศเป็นหลัก ทำให้ในประเทศไทยมี *C. militaris* ที่มีหลากหลายสายพันธุ์ย่อย ซึ่งอาจมีการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป และเมื่อมีการต่อเชื้อไปหลาย ๆ รุ่นอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมและเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ลดลงได้ (Chokeumnuay and Owatworakit, 2021) นอกจากนี้การเพาะเลี้ยง *C. militaris* ในฟาร์มต่าง ๆ ที่อยู่ในประเทศไทยต้องเปิดเครื่องปรับอากาศในการเพาะเลี้ยง เนื่องจาก *C. militaris* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส (Lee *et al.*, 2013a) ดังนั้นผู้เพาะเลี้ยงต้องรับภาระค่าไฟฟ้าที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาประมาณ 3-4 เดือน จนกระทั่งเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งขั้นตอนการเพาะเลี้ยง *C. militaris* ประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 2-3 สัปดาห์ จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเทียมเพื่อ

กระตุ้นให้เกิดการออกดอกโดยจะใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน ถึงจะเก็บผลผลิต (Taikhao *et al.*, 2018) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยง *C. militaris* ใช้เวลานานกว่าจะเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ดังนั้น ถ้าสามารถลดระยะเวลาในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งได้ก็จะถือว่าเป็นการประหยัดเวลาและต้นทุนในการเพาะเลี้ยง ยิ่งไปกว่านั้นได้มีรายงานว่า *Cordyceps* sp. แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มของเส้นใยได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ยังขึ้นกับอาหารที่ใช้ และสภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงอีกด้วย (Wang *et al.*, 2019; Werapan *et al.*, 2022)

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะเก็บตัวอย่าง *Cordyceps* sp. ที่เพาะเลี้ยงจากฟาร์มต่าง ๆ ในภาคกลางของประเทศไทยเพื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของกลุ่มเส้นใยของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหารแข็ง และศึกษาปริมาณชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มเส้นใยของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญเพื่อประหยัดต้นทุนและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ตลอดจนได้ไอโซเลตที่มีศักยภาพสูงในการผลิตชีวมวล และเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง *Cordyceps* sp.

เก็บตัวอย่าง *Cordyceps* sp. ในรูปดอกสดที่เพาะเลี้ยงภายในขวดแก้วจากฟาร์มต่าง ๆ ในภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 6 ฟาร์ม ประกอบด้วยฟาร์มในเขตอำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 3 ตัวอย่าง อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 3 ตัวอย่าง อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี

จำนวน 1 ตัวอย่าง อำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 1 ตัวอย่าง เขตหนองจอก กรุงเทพมหานคร จำนวน 1 ตัวอย่าง และอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 2 ตัวอย่าง มีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง โดยเก็บรักษาตัวอย่างในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งก่อนนำไปศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2. การเพาะเลี้ยง *Cordyceps* sp. บนอาหารแข็ง

ทำการตัดส่วนสโตรมา (Stroma) บริเวณก้านของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยตัดขึ้นให้มีขนาดเท่ากันมาวางบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) (อาหาร PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม น้ำตาลเดกซ์โตรส 20 กรัม น้ำตาลซูโครส 30 กรัม ผงวุ้น 20 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) (Dang *et al.*, 2018) จากนั้นนำตัวอย่าง *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่อยู่บนอาหาร PDA มาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (Singpoonga *et al.*, 2019)

3. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย *Cordyceps* sp.

นำส่วนของเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Slide culture คัดแปลงจาก Wijedasa and Liyanapathirana (2012) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำแผ่นแก้วปิดสไลด์ออกมาข้อมด้วย Lactophenol cotton blue และนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, BX51, Japan)

4. การศึกษาการเจริญของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp.

นำส่วนของกลุ่มเส้นใย (mycelium) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน มาตัดบริเวณรอบนอกสุดของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร แล้ววางบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (Singpoonga *et al.*, 2019) บันทึกลักษณะโคโลนี และประเมินความหนาแน่นของกลุ่มเส้นใยโดยใช้หลักเกณฑ์การให้เครื่องหมาย ตามวิธีการของ Shrestha *et al.* (2006) (+ = กลุ่มเส้นใยบาง ไม่พบบนอาหาร PDA ++ = กลุ่มเส้นใยฟูเล็กน้อยบนอาหาร PDA +++ = กลุ่มเส้นใยฟูปานกลางบนอาหาร PDA และ ++++ = กลุ่มเส้นใยฟูมากบนอาหาร PDA) ติดตามการเจริญของกลุ่มเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีด้วยเครื่องเวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier Caliper) ในหน่วยมิลลิเมตร ทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน และวัดอัตราการเจริญของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีตามวิธีของ Chokeumnuay and Owatworakit (2021) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การศึกษาชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มเส้นใยของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ

นำส่วนของกลุ่มเส้นใย (mycelium) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน มาตัดบริเวณรอบนอกสุดของโคโลนีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ในอาหาร PDB (Potato dextrose broth) 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและบรรจุอยู่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที (Taikhao *et al.*, 2018) เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาวัดชีวมวลโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ Wang *et al.* (2019) โดยนำตัวอย่างเส้นใย *Cordyceps* sp. ในอาหารเหลว 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น

นำตะกอนเส้นใย *Cordyceps* sp. มาล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

การวิเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ทำตามวิธีการของ Wang *et al.* (2019) นำตัวอย่างกลุ่มเส้นใยของ *Cordyceps* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB อายุ 14 วัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มา 2 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 xg เป็นเวลา 30 นาที และนำตะกอนเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และทำให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดเอทานอล จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำและนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid assay (DuBois *et al.*, 1956)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS 13.0 (SPSS Inc.) โดยวิธี One-way ANOVA โดยเลือกวิธี Duncan's test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

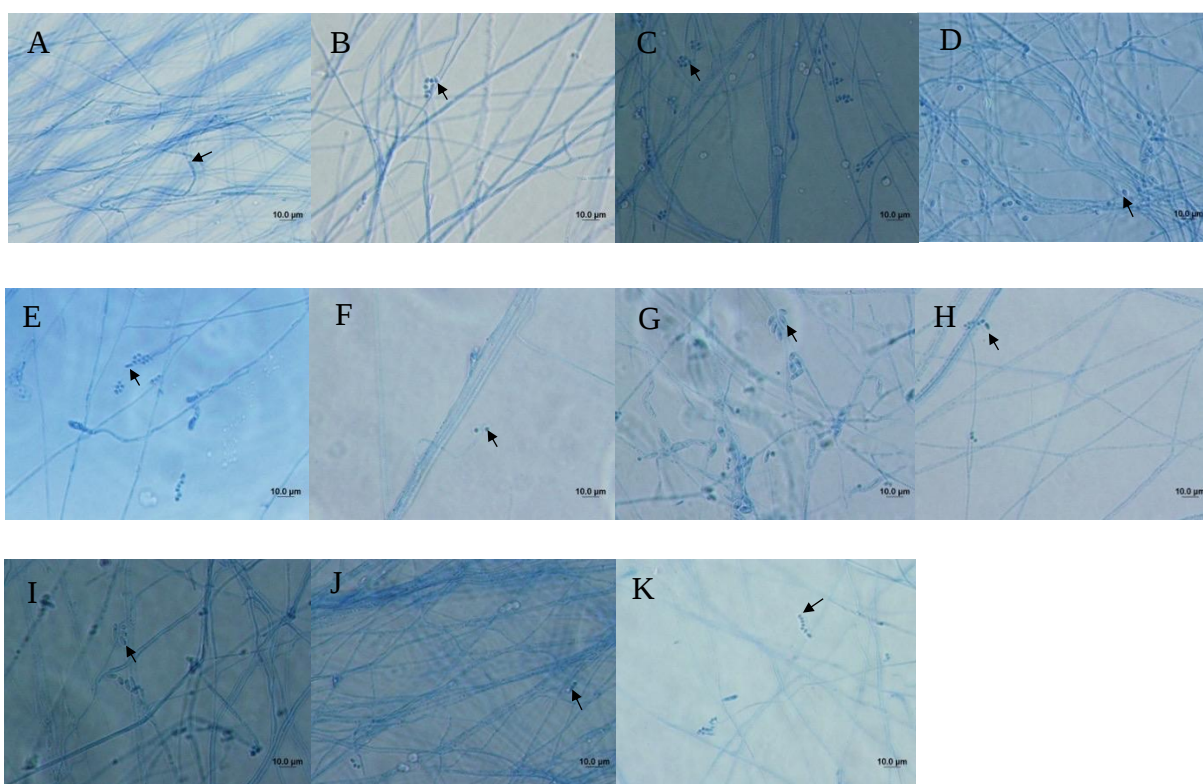
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ

จากการเก็บตัวอย่าง *Cordyceps* sp. ในรูปดอกสดที่เพาะเลี้ยงภายในขวดแก้วจากฟาร์มต่าง ๆ ในประเทศไทย จำนวน 6 ฟาร์ม มีจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง ดังนี้ ฟาร์มที่ 1 ในเขตอำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp01, CM-Sp02, และ CM-Sp03 ฟาร์มที่ 2 ในเขตอำเภอยะประแดง จังหวัดสมุทรปราการ ได้แก่ ไอโซเลต CM-

Sp04, CM-Sp05 และ CM-Sp06 ฟาร์มที่ 3 ในเขตอำเภอถ้ำลูกกา จังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp07 ฟาร์มที่ 4 ในเขตอำเภอบางเสาธง จังหวัดสมุทรปราการ ได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp08 ฟาร์มที่ 5 ในเขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp09 และฟาร์มที่ 6 ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ ได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp10 และ CM-Sp11 จากนั้นนำตัวอย่าง *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA และศึกษาลักษณะ

สัณฐานวิทยาของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยการทำ Slide culture และย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ผลการทดลองพบว่าทุกไอโซเลตสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน (Septate hypha) มีสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า โคนิเดียรูปทรงกลมและรูปทรงรีอยู่บริเวณปลายของเส้นใย โดยรูปร่างของโคนิเดียและขนาดของโคนิเดียมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลตแสดงดังภาพที่ 1 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยใช้เทคนิค Slide culture โดยตำแหน่งที่ถูกครีชีคือโคนิเดีย (A) ไอโซเลต CM-Sp01 (B) ไอโซเลต CM-Sp02 (C) ไอโซเลต CM-Sp03 (D) ไอโซเลต CM-Sp04 (E) ไอโซเลต CM-Sp05 (F) ไอโซเลต CM-Sp06 (G) ไอโซเลต CM-Sp07 (H) ไอโซเลต CM-Sp08 (I) ไอโซเลต CM-Sp09 (J) ไอโซเลต CM-Sp10 และ (K) ไอโซเลต CM-Sp11

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและรูปทรงโคนิเดียของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ

ไอโซเลต <i>Cordyceps</i> sp.	*เส้นผ่านศูนย์กลางโคนิเดีย (ไมโครเมตร)	รูปทรงโคนิเดีย
CM-Sp01	2.86 ± 0.12^c	รูปทรงกลม
CM-Sp02	2.87 ± 0.10^c	รูปทรงรี
CM-Sp03	1.43 ± 0.08^f	รูปทรงรี
CM-Sp04	1.79 ± 0.09^c	รูปทรงรี
CM-Sp05	2.51 ± 0.11^d	รูปทรงรี
CM-Sp06	2.52 ± 0.18^d	รูปทรงรี
CM-Sp07	3.57 ± 0.15^b	รูปทรงรี
CM-Sp08	1.86 ± 0.16^c	รูปทรงรี
CM-Sp09	3.59 ± 0.23^a	รูปทรงรี
CM-Sp10	2.51 ± 0.26^d	รูปทรงรี
CM-Sp11	2.50 ± 0.15^d	รูปทรงรี

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่อยู่ด้านบนในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการทดลองพบว่าไอโซเลต CM-Sp01 มีโคนิเดียรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 2.86 ± 0.12 ไมโครเมตร ในขณะที่ไอโซเลตอื่น ๆ มีโคนิเดียรูปทรงรี โดยมีขนาดโคนิเดียตั้งแต่ $3.59-1.43$ ไมโครเมตร ซึ่งไอโซเลต CM-Sp09 เป็นไอโซเลตที่มีโคนิเดียขนาดใหญ่ที่สุด (3.59 ± 0.23 ไมโครเมตร) โดยทั่วไปแล้ว *C. militaris* เป็นราในไฟลัม Ascomycota ชั้น Ascomycetes อันดับ Hypocreales วงศ์ Clavicipitaceae และจีโนม Cordyceps (Kontogiannatos *et al.*, 2021) มีเส้นใยแบบมีผนังกัน (Septate hyphae) และสามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) ที่เรียกว่าโคนิเดียได้ที่บริเวณปลายของเส้นใย (Lou *et al.*, 2019b) จากการศึกษาลักษณะของเส้นใยและโคนิเดียในการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Shrestha *et al.* (2005) ที่ได้ศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *C. militaris* EFCC 11255 ได้ก่อกำเนิด

จุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบการงอกของโคนิเดียในระยะเวลา 36 ชั่วโมง โคนิเดียมีรูปทรงกระบอกหรือรูปทรงรี ระยะเวลาต่อมา 48 ชั่วโมง จะเปลี่ยนเป็นรูปทรงกลมจนถึงทรงรี นอกจากนี้ผลการศึกษาโคนิเดียที่มีรูปร่างกลมของไอโซเลต CM-Sp01 ยังมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zheng *et al.* (2011) ที่ได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตและฟิโนไทป์ที่มีความหลากหลายของ *C. militaris* พบว่าโคนิเดียมีรูปร่างกลมเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อย่างไรก็ตามลักษณะพื้นฐานวิทยาของโคนิเดียตลอดจนสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการงอกของสปอร์ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลโดยตรงกับการเจริญเติบโตของกลุ่มเส้นใยได้ (Shrestha *et al.*, 2005) ในกรณีดังกล่าวต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการงอกของสปอร์ ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของสปอร์ ใน *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ เพื่อให้เข้าใจ

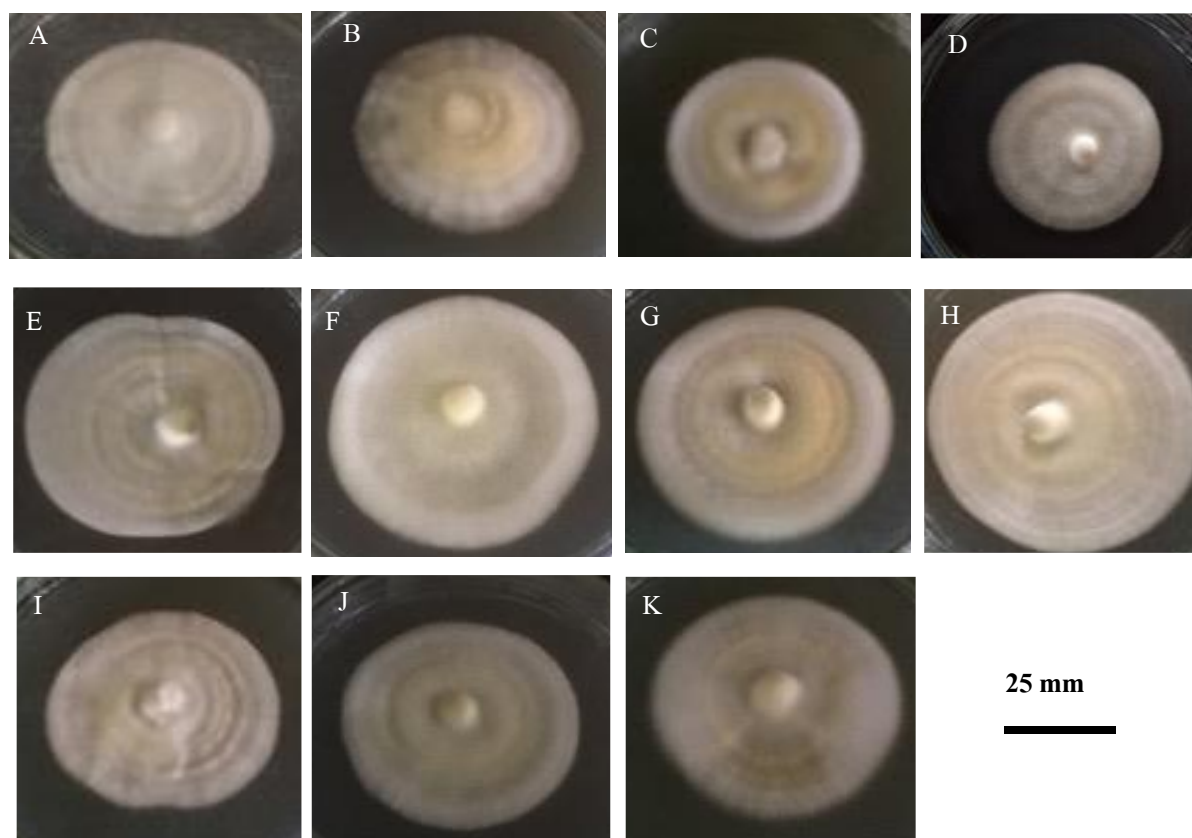
ลักษณะของโคนิเดียและการงอกของสปอร์มีความสอดคล้องกันหรือไม่

2. ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของกลุ่มเส้นใย

Cordyceps sp. ไอโซเลตต่าง ๆ

การศึกษาลักษณะโคโลนีของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีของกลุ่มเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA พบว่า *Cordyceps* sp. ทุกไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีสีขาว โคนิเดียสีขาว Vegetative mycelium และ Aerial mycelium มีสีขาว (ภาพที่ 2 และตารางที่ 2) และจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อได้รับแสงสว่าง ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนสีของเส้นใยสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Shrestha *et al.* (2006) ที่ได้ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย *C. militaris* EFCC C-7159 บนอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทั้งในที่สว่างและที่มืด พบว่าเส้นใยที่เพาะเลี้ยงในที่สว่างมีลักษณะสีขาวเหลืองจนถึงเหลืองอ่อน ส่วนในที่มืดพบว่าเส้นใยมีสีขาวและยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ha *et al.* (2022) ที่ศึกษาลักษณะการเจริญของกลุ่มเส้นใย *C. militaris* KCCM 60304 บนอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน พบว่ากลุ่มของเส้นใยมีลักษณะโคโลนีสีขาว มี Vegetative mycelium และ Aerial mycelium เป็นสีขาวมีลักษณะฟูเต็มผิวหน้าอาหารในจานเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่างๆ บนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 วัน (A) ไอโซเลต CM-Sp01 (B) ไอโซเลต CM-Sp02 (C) ไอโซเลต CM-Sp03 (D) ไอโซเลต CM-Sp04 (E) ไอโซเลต CM-Sp05 (F) ไอโซเลต CM-Sp06 (G) ไอโซเลต CM-Sp07 (H) ไอโซเลต CM-Sp08 (I) ไอโซเลต CM-Sp09 (J) ไอโซเลต CM-Sp10 และ (K) ไอโซเลต CM-Sp11

นอกจากนี้เมื่อศึกษาลักษณะความหนาแน่นของกลุ่มเส้นใยเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 21 วัน พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความหนาแน่นของเส้นใยแตกต่างกัน โดยไอโซเลท CM-Sp02 มีความหนาแน่นของเส้นใยมากที่สุด โดยเส้นใยมีลักษณะฟูมากบนอาหาร PDA (ตารางที่ 2) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเจริญของเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหารแข็ง PDA มีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลททั้งลักษณะการเจริญ และความหนาแน่นของเส้นใย ได้มีรายงานวิจัยของ Dang *et al.* (2018) ที่ศึกษาการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใย *C. militaris* strain AG-1 และ *C. militaris* strain PSJ-1 พบว่าเมื่อแปรผันชนิดของอาหารที่แตกต่างกัน (อาหาร C-DOX MYPS และ PDA) ความหนาแน่นของเส้นใย *C. militaris*

strain PSJ-1 มีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยง *C. militaris* strain PSJ-1 ในอาหาร C-DOX มีความหนาแน่นของเส้นใยมากที่สุดและสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA โดยในอาหาร C-DOX ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมาย เช่น Sucrose NaNO_3 KH_2PO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ KCl ในขณะที่เดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยง *C. militaris* strain AG-1 ในอาหารที่แตกต่างกันความหนาแน่นของเส้นใยไม่ได้แตกต่างกัน แต่ความหนาแน่นของเส้นใย *C. militaris* strain AG-1 มีความแตกต่างกันเมื่อแปรผันอุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอน เป็นการแสดงให้เห็นว่าการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใย *Cordyceps* sp. แต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น สารอาหาร อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณแสง เป็นต้น

ตารางที่ 2 ลักษณะสีและความหนาแน่นของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร PDA ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน ในที่มืด

ไอโซเลท <i>Cordyceps</i> sp.	ลักษณะสีของกลุ่มเส้นใย		ความหนาแน่นของกลุ่มเส้นใย
	Vegetative mycelium	Aerial mycelium	
CM-Sp01	สีขาว	สีขาว	+++
CM-Sp02	สีขาว	สีขาว	++++
CM-Sp03	สีขาว	สีขาว	++
CM-Sp04	สีขาว	สีขาว	+++
CM-Sp05	สีขาว	สีขาว	+++
CM-Sp06	สีขาว	สีขาว	++
CM-Sp07	สีขาว	สีขาว	++
CM-Sp08	สีขาว	สีขาว	+
CM-Sp09	สีขาว	สีขาว	+
CM-Sp10	สีขาว	สีขาว	++
CM-Sp11	สีขาว	สีขาว	+++

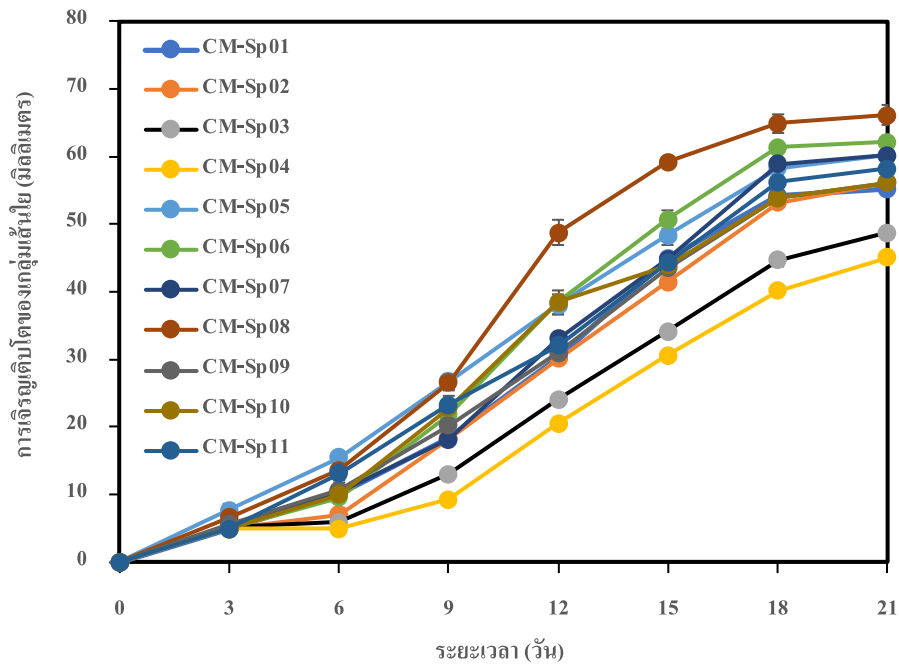
หมายเหตุ +: เส้นใยบาง ไม่ฟูบนอาหาร PDA
 ++: เส้นใยฟูเล็กน้อยบนอาหาร PDA
 +++: เส้นใยฟูปานกลางบนอาหาร PDA
 ++++: เส้นใยฟูมากบนอาหาร PDA

3. ผลการศึกษาการเจริญของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp.

ไอโซเลตต่าง ๆ

การศึกษาการเจริญของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดพบว่า *Cordyceps* sp. ไอโซเลต CM-Sp01 CM-Sp05 CM-Sp06 CM-Sp07 CM-Sp08 CM-Sp09 CM-Sp10 และ CM-Sp11 ในช่วงระยะเวลา 3 วันแรกกลุ่มเส้นใยมีการเจริญช้า ซึ่งจัดเป็นระยะ Lag (Lag phase) เนื่องจากเชื้อรามีการปรับตัวกับอาหารใหม่ หลังจากนั้นกลุ่มเส้นใยจึงเจริญมากขึ้นเข้าสู่ระยะ Log (Log phase) ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไปจนถึงประมาณวันที่ 18 โดยเฉพาะไอโซเลต CM-Sp08 ที่มีการเจริญที่รวดเร็ว (ภาพที่ 3) หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่และเข้าสู่ระยะ Stationary (Stationary phase) (ภาพที่ 3) ในขณะที่ไอโซเลต CM-Sp02 CM-Sp03 และ CM-Sp04 ระยะ Lag จะใช้เวลานานถึงประมาณ 6 วัน จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ Log (ภาพที่ 3) โดยรูปแบบการเจริญของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลต CM-Sp01 CM-Sp05 CM-Sp06 CM-Sp07 CM-Sp08 CM-Sp09 CM-Sp10 และ CM-Sp11 สอดคล้องกับการเจริญของกลุ่มเส้นใย *C. militaris* DSMZ 23612 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน (Soltani *et al.*, 2015) นอกจากนี้ เมื่อวัดอัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใย พบว่าไอโซเลต CM-Sp08

เป็นไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญสูงที่สุด (ภาพที่ 3) และแตกต่างจากไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการเจริญของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 5.06 ± 0.65 มิลลิเมตรต่อวัน (ตารางที่ 3) และไอโซเลต CM-Sp04 เป็นไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญต่ำที่สุด (ภาพที่ 3) โดยมีอัตราการเจริญของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 2.84 ± 0.32 มิลลิเมตรต่อวัน (ตารางที่ 3) โดยเมื่อนำอัตราการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลต CM-Sp08 ไปเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นที่มีรายงานพบว่า ไอโซเลต CM-Sp08 มีอัตราการเจริญเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าไอโซเลต *C. militaris* strain 'Yedang 3' (ประมาณ 3.5 มิลลิเมตรต่อวัน) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่ค่า pH 6 อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในที่มีด (Lee *et al.*, 2013a) และมากกว่า *C. militaris* strain ATCC 34165 (ประมาณ 3.5 มิลลิเมตรต่อวัน) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่เสริมด้วยเปปโตเน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มีด (Chokeumnuay and Owatworakit, 2021) เป็นการแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต CM-Sp08 เป็นไอโซเลตที่มีการเจริญที่อย่างรวดเร็ว เหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตเส้นใยหรือมวลชีวภาพเพื่อต่อยอดในการสกัดสารต่าง ๆ จากเส้นใยมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ กลูแคน แมนแนน อะดีโนซีน และคอร์ไดเซปิน เป็นต้น



ภาพที่ 3 การเจริญของกลุ่มเส้นใย *C. militaris* ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหาร PDA โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่ระยะเวลา 21 วันในที่มีดที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าแต่ละไอโซเลตมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีอยู่ในช่วง 45.11-66.12 มิลลิเมตร ซึ่งไอโซเลต CM-Sp08 มีการเจริญของกลุ่มเส้นใยดีที่สุดแตกต่างจากไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกว้างเท่ากับ 66.12 ± 1.45 มิลลิเมตร และสอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญที่สูงที่สุดเช่นกัน (ตารางที่ 3) รองลงมาได้แก่ ไอโซเลต CM-Sp06 CM-Sp07 CM-Sp05 CM-Sp11 CM-Sp02 CM-Sp10 CM-Sp08 CM-Sp01 CM-Sp03 และ CM-Sp08 โดยไอโซเลต CM-Sp01 CM-Sp02 CM-Sp10 CM-Sp09 และ CM-Sp11 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลต CM-Sp04

มีการเจริญช้าที่สุด และสอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญที่ต่ำที่สุดเช่นกัน (ตารางที่ 3) โดยได้มีรายงานการเจริญของกลุ่มของเส้นใย *C. militaris* พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีการการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อาหาร ระยะเวลา และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยไอโซเลต CM-Sp08 มีการเจริญของโคโลนีของกลุ่มเส้นใยมากกว่า *C. militaris* DSMZ 23612 (48.00 มิลลิเมตร) (Soltani et al., 2015) และมีค่าใกล้เคียงกับ *C. militaris* strain 'Yedang 3' (67.20 มิลลิเมตร) (Lee et al., 2013a) ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มีสภาวะและเวลาในการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 12 วันในการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA พบว่าไอโซเลต CM-Sp08 มีการเจริญของโคโลนีของกลุ่มเส้นใยมากกว่า *C. militaris* AG-1 (48.40 มิลลิเมตร) และ *C. militaris* PSJ-1 (45.20 มิลลิเมตร) (Dang et al., 2018) อย่างไรก็ตามการเจริญของโคโลนีของกลุ่มเส้นใยในไอโซเลต CM-Sp08 มีค่า

น้อยกว่า *C. militaris* DSMZ 23612 (77.00 มิลลิเมตร) (Soltani *et al.*, 2015) ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร PDA เสริมด้วยยีสต์สกัดและมอลต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เส้นใยมีการเจริญได้ดีขึ้น ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ใช้เพียงอาหาร PDA ที่ไม่ได้เติมสารอาหารอื่น ๆ เพิ่มเติม ถือเป็นการประหยัดต้นทุนในการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังเป็นสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมแล้วต่อการเจริญของกลุ่มเส้นใย *C. militaris* (Maftoun *et al.*, 2013) โดยงานวิจัยนี้ทำให้ทราบ

เบื้องต้นว่า *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 มีความสามารถในการเจริญและใช้เวลาอย่างรวดเร็วในการเจริญบนอาหาร PDA ปกติที่ไม่ได้เติมสารอาหารอื่น ๆ เพิ่มเติม เป็นการประหยัดเวลาและต้นทุนในการเพาะเลี้ยง และยังเป็นข้อมูลที่สำคัญในการคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพดังกล่าวไปใช้ในการเจริญในอาหารเทียมเพื่อชักนำให้เกิดการออกดอกหรือสามารถนำไปต่อยอดผลิตมวลชีวภาพจากเส้นใยเพื่อสกัดสารต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ต่อไป

ตารางที่ 3 อัตราการเจริญและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน

ไอโซเลท	*อัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใย (มิลลิเมตร/วัน)	*เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของกลุ่ม เส้นใย (มิลลิเมตร)
CM-Sp01	3.87 ± 0.31 ^c	55.11 ± 0.56 ^d
CM-Sp02	3.83 ± 0.42 ^d	56.15 ± 0.98 ^d
CM-Sp03	3.13 ± 0.66 ^h	48.75 ± 0.96 ^c
CM-Sp04	2.84 ± 0.32 ⁱ	45.11 ± 0.55 ^f
CM-Sp05	3.64 ± 0.67 ^f	60.12 ± 1.12 ^{bc}
CM-Sp06	4.56 ± 0.19 ^b	62.14 ± 0.98 ^b
CM-Sp07	3.82 ± 0.45 ^d	60.18 ± 0.78 ^{bc}
CM-Sp08	5.06 ± 0.65 ^a	66.12 ± 1.45 ^a
CM-Sp09	3.64 ± 0.54 ^f	56.12 ± 0.89 ^d
CM-Sp10	3.77 ± 2.98 ^e	56.13 ± 1.12 ^d
CM-Sp11	3.45 ± 1.18 ^e	58.23 ± 1.22 ^{cd}

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่อยู่ด้านบนในแนวดิ่งที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 การเจริญของกลุ่มเส้นใย *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ในการศึกษาครั้งนี้ เทียบกับ *Cordyceps* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล

สายพันธุ์ <i>Cordyceps</i> sp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของกลุ่มเส้นใย (มิลลิเมตร)	สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Cordyceps</i> sp. CM-Sp08	66.12 ± 1.45	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน	การศึกษาในครั้งนี้
<i>Cordyceps</i> sp. CM-Sp08	48.78 ± 1.96	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 12 วัน	การศึกษาในครั้งนี้
<i>Cordyceps militaris</i> DSMZ 23612	48.00	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน	Soltani <i>et al.</i> (2015)
<i>Cordyceps militaris</i> strain 'Yedang 3'	67.2	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน	Lee <i>et al.</i> (2013a)
<i>Cordyceps militaris</i> DSMZ 23612	77.00	อาหาร PDA ที่เสริมด้วยยีสต์สกัด 4 กรัม ต่อลิตร และมอลต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 21 วัน	Soltani <i>et al.</i> (2015)
<i>Cordyceps militaris</i> AG-1	48.40	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 12 วัน	Dang <i>et al.</i> (2018)
<i>Cordyceps militaris</i> PSJ-1	45.20	อาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 12 วัน	Dang <i>et al.</i> (2018)

4. ผลการศึกษาชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของกลุ่มเส้นใยใน *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ

จากการศึกษาปริมาณชีวมวลของกลุ่มเส้นใยใน *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ โดยวัดจากน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ให้ปริมาณชีวมวลสูงสุดและแตกต่างจากไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณชีวมวลเท่ากับ 55.20 ± 1.65 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวัดการเจริญบนอาหารแข็ง PDA (ภาพที่ 3 และตารางที่ 3) และจากการศึกษาปริมาณ

เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ พบว่า *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ให้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 2.86 ± 0.05 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) และยังให้ค่าผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 51.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) โดยได้มีรายงานการศึกษาปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ใน *Cordyceps* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยไอโซเลท CM-Sp08 มีปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่า *Cordyceps militaris*

BCC2819 (0.84 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ในพลาสติก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 11 วัน (Werapan *et al.*, 2022) และสูงกว่า *Cordyceps militaris* BCRC 33735 (2.30 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสม (optimal medium) ในพลาสติกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 14 วัน (Wang *et al.*, 2019) และยิ่งสูงกว่า *Cordyceps militaris* ATCC 26848 (1.5 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสม (optimal medium) pH 6 ในพลาสติกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 16 วัน (Shih *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไอโซเลท CM-Sp08 มีปริมาณน้อยกว่า *Cordyceps militaris* BCRC 33735 (5.7 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยมีหมัก

แบบกะซ้ำ (repeated batch fermentation) ในอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสม (optimal medium) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 14 วัน (Wang *et al.*, 2019) และยิ่งน้อยกว่า *Cordyceps cicadae* BCC 19788 (4.96 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงอาหาร PDB ในพลาสติกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นเวลา 11 วัน (Werapan *et al.*, 2022) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ใช้และสายพันธุ์ของ *Cordyceps* sp. มีผลต่อปริมาณการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยในอนาคตที่ผู้วิจัยวางแผนจะหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของไอโซเลท CM-Sp08 เพื่อให้ได้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง และจะระบุสายพันธุ์โดยการศึกษายีน 18S rDNA และยีน ITS ต่อไป

ตารางที่ 5 ปริมาณชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของกลุ่มเส้นใยใน *Cordyceps* sp. ไอโซเลทต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มีดเป็นระยะเวลา 14 วัน

ไอโซเลท	*น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)	*เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัม/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง)
CM-Sp01	51.60 ± 2.79 ^c	2.44 ± 0.02 ^b	47.28 ^c
CM-Sp02	50.00 ± 1.32 ^d	2.42 ± 0.03 ^b	48.40 ^c
CM-Sp03	39.60 ± 1.56 ^h	1.92 ± 0.07 ^{cd}	48.48 ^c
CM-Sp04	38.40 ± 1.20 ^h	1.82 ± 0.03 ^d	47.39 ^{de}
CM-Sp05	44.64 ± 1.67 ^f	2.22 ± 0.05 ^{bc}	49.73 ^b
CM-Sp06	53.50 ± 4.00 ^b	2.48 ± 0.05 ^b	46.35 ^f
CM-Sp07	50.12 ± 1.50 ^{cd}	2.43 ± 0.06 ^b	48.48 ^c
CM-Sp08	55.20 ± 1.65 ^a	2.86 ± 0.05 ^a	51.81 ^a
CM-Sp09	44.60 ± 1.07 ^f	2.21 ± 0.03 ^{bc}	49.55 ^b
CM-Sp10	46.30 ± 1.30 ^c	2.23 ± 0.08 ^{bc}	48.16 ^c
CM-Sp11	42.00 ± 1.90 ^g	2.00 ± 0.02 ^{cd}	47.61 ^d

หมายเหตุ: * คือค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และตัวอักษรที่อยู่ด้านบนในแนวตั้งที่แตกต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของกลุ่มเส้นใยใน *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ในการศึกษาครั้งนี้ เทียบกับ *Cordyceps* sp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล

สายพันธุ์ <i>Cordyceps militaris</i>	เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	เอกสารอ้างอิง
<i>Cordyceps</i> sp. CM-Sp08	2.86 ± 0.05	เพาะเลี้ยงในพลาสติกอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 14 วัน	การศึกษาในครั้งนี้
<i>Cordyceps militaris</i> BCC2819	0.84	เพาะเลี้ยงในพลาสติกอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 11 วัน	Werapan <i>et al.</i> (2022)
<i>Cordyceps cicadae</i> BCC 19788	4.96	เพาะเลี้ยงในพลาสติกอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 11 วัน	Werapan <i>et al.</i> (2022)
<i>Cordyceps militaris</i> BCRC 33735	2.30	เพาะเลี้ยงในพลาสติกอาหารเหลว สูตรที่เหมาะสม (optimal medium) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 14 วัน	Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>Cordyceps militaris</i> BCRC 33735	5.70	เพาะเลี้ยงในถังหมัก หมักแบบกะซ้ำ (repeated batch fermentation) อาหารเหลวสูตรที่เหมาะสม (optimal medium) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 14 วัน	Wang <i>et al.</i> (2019)
<i>Cordyceps militaris</i> ATCC 26848	1.50	เพาะเลี้ยงในพลาสติกอาหารเหลว สูตรที่เหมาะสม (optimal medium) pH 6 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 16 วัน	Shih <i>et al.</i> (2007)

สรุป

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและการเจริญของกลุ่มเส้นใยของ *Cordyceps* sp. จำนวน 11 ตัวอย่างที่เก็บจากฟาร์มต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 6 ฟาร์ม เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิค Slide culture พบว่า *Cordyceps* sp. ทุกไอโซเลทสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน มีโคนิเดียรูปทรงกลมและรูปทรงรี อยู่บริเวณปลายของเส้นใย โดยขนาดและรูปร่างของโคนิเดีย

มีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท โดยไอโซเลท CM-Sp01 มีโคนิเดียเป็นรูปทรงกลมแตกต่างจากไอโซเลทอื่นที่เป็นรูปทรงรี ในขณะที่ไอโซเลท CM-Sp09 มีขนาดโคนิเดียใหญ่ที่สุด เมื่อศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA พบว่าทุกไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีขาว มี Vegetative mycelium และ Aerial mycelium เป็นสีขาว โดยไอโซเลท CM-Sp02 เป็นไอโซเลทที่มีความหนาแน่นของเส้นใยมากที่สุด การศึกษาการเจริญของกลุ่มเส้นใย

บนอาหาร PDA พบว่าไอโซเลท CM-Sp08 มีอัตราการเจริญของกลุ่มเส้นใยดีที่สุด และมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากที่สุด โดยจากการทดลองนี้ทำให้ทราบเบื้องต้นว่า *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารแข็งได้ดีที่สุดและใช้เวลาอย่างรวดเร็วในการเจริญ ซึ่งจะเป็ข้อมูลที่สำคัญในการคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการเจริญดังกล่าวไปใช้ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมเพื่อชักนำให้เกิดการออกดอกต่อไป อีกทั้งการเจริญที่รวดเร็วของเส้นใยบนอาหาร PDA จะลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงลง ซึ่งจะเป็นการประหยัดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่ท้องไ้ นอกจากนี้ *Cordyceps* sp. ไอโซเลท CM-Sp08 ยังมีศักยภาพในการผลิตชีวมวลและเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดเพื่อผลิตในระดับขนาดใหญ่ (large scale) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปีงบประมาณ 2563 ผ่านหน่วยงานมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Chen, B., Sun, Y., Luo, F. and Wang, C. 2020a. Bioactive metabolites and potential mycotoxins produced by *Cordyceps* fungi: A review of safety. **Toxins** 12(6): 410-422.
- Chen, B.X., Wei, T., Xue, L.N., Zheng, Q.W., Ye, Z.W., Zou, Y., Yang, Y., Yun, F., Guo, L.Q.

and Lin, J.F. 2020b. Transcriptome analysis reveals the flexibility of cordycepin network in *Cordyceps militaris* activated by L-Alanine addition. **Frontiers in Microbiology** 11: 577.

ChokeUmuay, N. and Owatworakit, A. 2021. Effect of successive subculture of *Cordyceps militaris* on growth, metabolites production and stability of *Rhfl* gene. **Agriculture and Natural Resources** 55(4): 537-546.

Dang, H.N., Wang, C.L. and Lay, H.L. 2018. Effect of nutrition, vitamin, grains, and temperature on the mycelium growth and antioxidant capacity of *Cordyceps militaris* (strains AG-1 and PSJ-1). **Journal of Radiation Research and Applied Sciences** 11: 130-138.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28(3): 350-356.

Ha, S.Y., Jung, J.Y., Park, H.M. and Yang, J.K. 2022. Comparison of the metabolic profile of the mycelia and fruiting bodies of artificially cultured *Cordyceps militaris*. **Journal of Mushrooms** 20(1): 13-21.

Kontogiannatos, D., Koutrotsios, G., Xekalak, S. and Zervakis, G.I. 2021. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*-A review of various aspects and recent trends towards

- the exploitation of a valuable fungus. **Journal of Fungi** 7(11): 986.
- Kunhorm, P., Chaicharoenaudomrung, N. and Noisa, P. 2019. Enrichment of cordycepin for cosmeceutical applications: culture systems and strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology** 103(4): 1681-1691.
- Lee, B.J., Lee, M.A., Kim, Y.G., Lee, K.W., Choi, Y.S., Lee, B.E. and Song, H.Y. 2013a. Cultural characteristics of *Cordyceps militaris* strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. **Journal of Mushroom Science and Production** 11(3): 124-130.
- Lee, S.Y., Debnath, T., Kim, S.K. and Lim, B.O. 2013b. Anti-cancer effect and apoptosis induction of cordycepin through DR3 pathway in the human colonic cancer cell HT-29. **Food and Chemical Toxicology** 60: 439-447.
- Lou, H.W., Lin, L.F., Guo, L.Q., Wang, X.W., Tian, S., Liu C., Zhao, Y. and Zhao, R. 2019b. Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration. **Applied Microbiology and Biotechnology** 103(19): 7835-7841.
- Lou, H.W., Zhao, Y., Tang, H.B., Ye, Z.W., Wei, T., Lin, J.F. and Guo, L.Q. 2019a. Transcriptome analysis of *Cordyceps militaris* reveals genes associated with carotenoid synthesis and identification of the function of the cmtns Gene. **Frontiers in Microbiology** 10: 2105.
- Maftoun, P., Malek, R., Abbas, M., Aziz, R. and Enshasy, H.E. 2013. Bioprocess for semi-industrial production of immunomodulatory polysaccharide pleuran by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Journal of Scientific and Industrial Research** 72(11): 655-662.
- Nurmamat, E., Xiao, H., Zhang, Y. and Jiao, Z. 2018. Effects of different temperatures on the chemical structure and antitumor activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris*. **Polymers** 10(4): 430.
- Shih, I.L., Tsai, K.L. and Hsieh, C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. **Biochemical Engineering Journal** 33(3): 193-201.
- Shrestha, B., Han, S., Yoon, K. and Sung, J. 2005. Morphological characteristics of conidiogenesis in *Cordyceps militaris*. **Mycobiology** 33(2): 69-76.
- Shrestha, B., Lee, W.H., Han S.K. and Sung J.M. 2006. Observations on Some of the Mycelial Growth and Pigmentation Characteristics of *Cordyceps militaris* Isolates. **Mycobiology** 34(2): 83-91.
- Singpoonga, N., Sang-on, B. and Chaiprasart, P. 2019. Effects of preservation method on fruiting body formation and cordycepin production of *Cordyceps militaris* culture. **Agriculture and Natural Resources** 53(2): 106-113.
- Soltani, M., Al-Ali, M., Othman, N.Z., Malik, R., Elmarzugi, N., Aziz, R. and El-Enshasy, H.A. 2015. Medium composition effects on growth kinetic of *Cordyceps militaris* cells using agar

- plate method. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences** 10(1): 79-82.
- Taikhao, S., Fueangfung, S., Leasen, S. and Lorwongtragool, P. 2018. Study of cultivation substrate materials on growth and bioactive compounds production in *Cordyceps militaris*, pp. 434-443. In Watjanatepin, N., ed. **The 3rd National Conferences Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi**. Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi. (in Thai)
- Wang, C.C., Wu, J.Y., Chang, C.Y., Yu, S.T. and Liu, Y.C. 2019. Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 127(4): 499-505.
- Wang, F., Song, X., Dong, X., Zhang, J. and Dong, C. 2017. DASH- type cryptochromes regulate fruiting body development and secondary metabolism differently than CmWC-1 in the fungus *Cordyceps militaris*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 101(11): 4645-4657.
- Wang, L., Xu, N., Zhang, J., Zhao, H., Lin, L., Jia, S. and Jia, L. 2015. Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of residue polysaccharide from *Cordyceps militaris* SU-12. **Carbohydrate Polymers** 131: 355-362.
- Werapan, B., Nutaratat, P., Ariyaphuttrat, S. and Prathumpai, W. 2022. Cordycepin production by the potential fungal strains *Cordyceps militaris* BCC 2819 and *Cordyceps cicadae* BCC 19788 in submerged culture during batch and Fed-batch fermentation. **African Journal of Biotechnology** 21(10): 483-503.
- Wijedasa, M.H. and Liyanapathirana, L.V.C. 2012. Evaluation of an alternative slide culture technique for the morphological identification of fungi species. **Sri Lanka Journal of Infectious Diseases** 2(2): 47-52.
- Wu, H., Rao, Z.C., Cao, L., De Clercq, P. and Han, R.C. 2020. Infection of *Ophiocordyceps sinensis* fungus causes dramatic changes in the microbiota of its *Thitarodes* host. **Frontiers in Microbiology** 11: 577268.
- Xia, Y., Luo, F., Shang, Y., Chen, P., Lu, Y. and Wang, C. 2017. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin. **Cell Chemical Biology** 24(12): 1479-1489.
- Yin, J., Xin, X.D., Weng, Y.J., Li, S.H., Jia, J.Q. and Gui, Z.Z. 2018. Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori*. **Entomological Research** 48(3): 137-144.
- Zhang, J., Wen, C., Duan, Y., Zhang, H. and Ma, H. 2019. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review. **International Journal of Biological Macromolecules** 132: 906-914.
- Zhao, H., Lai, Q., Zhang, J., Huang, C. and Jia, L. 2018. Antioxidant and hypoglycemic effects of acidic-extractable polysaccharides from

Cordyceps militaris on type 2 diabetes mice.

Oxidative Medicine Cellular Longevity

2018: 9150807.

Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G., Xiong, C., Hu, X.,
Zhang, S., Zheng, H., Huang, Y., Zhou, Y.,
Wang, S., Zhao, G., Liu, X., Leger, R.J.S.
and Wang, C. 2011. Genome sequence of
the insect pathogenic fungus *Cordyceps*
militaris, a valued traditional chinese
medicine. **Genome Biology** 12(11): 1-21.