

การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดงาโดยใช้หัวเชื้อเหลวและ
หัวเชื้อแข็งของ *Cordyceps militaris* บนเมล็ดธัญพืช
A Comparaive Study of *Cordyceps militalis* (Tung Chao) Culture
from Liquid and Solid Inoculation on Growth Medium Mixed
with Thai Millet

พันเอกหญิง ผศ. เยาวภา ทองอร่าม

กองวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ส่วนการศึกษา โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า

Email: ybird16 @ yahoo.com

บทคัดย่อ : การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดงาโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *Cordyceps militaris* บนเมล็ดธัญพืช ซึ่งในระยะแรกของการวิจัยต้องเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยการเชื้อจากถังเห็ดงาสดลงบนอาหารแข็งใช้ระยะเวลาประมาณ 30 วัน เชื้อจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ซึ่งสามารถใช้เชื้อเริ่มต้นนี้เป็นหัวเชื้อแข็งได้ ในขณะที่หัวเชื้อเหลวนั้นต้องนำเชื้อเริ่มต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวประมาณ 4.3 วัน จากนั้นนำหัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งมาเพาะเลี้ยงบนเมล็ดลูกเดือยที่ผสมอาหารเสริมอื่นๆ และควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง จากการวิจัยพบว่าการใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งมีระยะการเจริญเติบโตดังนี้ ระยะการเจริญของเส้นใยเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ 44.8 วัน และ 58.2 วันตามลำดับ ระยะเวลาที่สีของเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีส้ม 48.8 วัน และ 62.3 วัน ตามลำดับ ระยะการพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก 53.9 วัน และ 67.7 วัน ตามลำดับ และระยะการพัฒนาของตุ่มดอกเป็นดอก 73.7 วัน และ 97 วัน ตามลำดับ จากการเก็บผลผลิตถึงเห็ดงาที่ใช้หัวเชื้อเหลวไปชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยง ชั่งน้ำหนักได้ 46.18 กรัม และ 9.43 กรัมตามลำดับ เมื่อใช้หัวเชื้อแข็งชั่งน้ำหนักได้ 40.18 กรัม และ 7.39 กรัมตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงถึงเห็ดงาโดยใช้หัวเชื้อเหลวนั้นมีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดีกว่าการเพาะเลี้ยงถึงเห็ดงาโดยใช้หัวเชื้อแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

คำสำคัญ : *Cordyceps militaris*, หัวเชื้อเหลว, หัวเชื้อแข็ง

Abstract : A comparative study of *Cordyceps militaris* or Tung Chao culture was successfully performed on growth medium mixed with Thai millet. The liquid and solid inoculation were prepared from culturing a fruiting body of *Cordyceps militaris* on solid medium for 30 days. Within 30 days, the mycelium grew fully on the medium surface and was used as a solid inoculation, while the liquid inoculation was produced further by mixing it in broth medium (PDB) for 4.3 days. Both inoculations were cultured in Thai millet mixed with other nutrient supplements where temperature, moisture, and light were controlled during the study.

From liquid inoculation, mycelial production, mycelial color (orange), duration of mycelial to primodial production, and duration of primodial to stroma production were at 44.8, 48.8, 53.9 and 73.7 days respectively; while those from solid inoculation were at 58.2, 62.3, 67.7 and 97 days, respectively. Fresh and dry weights were measured after harvestation. The liquid and solid inoculations yielded 46.18 and 9.43 grams, 40.18 and 7.39 grams of fresh and dry weights respectively. The liquid inoculation resulted in a better stroma production and stroma yield with statistical significant of 95%

Keyword: *Cordyceps militaris*, liquid inoculation, solid inoculation

1. บทนำ

ถั่งเช่าจัดเป็นสมุนไพร สกุลคอร์โดเซฟ (*Cordyceps genus*) ราแมลงในกลุ่มนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่มากมายหลายแหล่ง มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นประโยชน์ [1] ถั่งเช่ามีหลายชนิด แต่ที่มีชื่อเสียงและเป็นที่รู้จัก ได้แก่ ถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) ถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes* (Peck.)) ถั่งเช่าจ๊กจั่น (*Isaria sinclairii* (Berk.) Lloyd) และถั่งเช่าสีทอง (*C. militalis* (L.) Link) ถั่งเช่าได้มีการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและอาหารบำรุงร่างกายของคนพื้นบ้านในแถบเอเชียตะวันออกมาตั้งแต่อดีตกาล [2] ถั่งเช่ามีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญหลาย

อย่าง เช่น โปรตีน ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน และกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย และยังเป็นประโยชน์ต่อการผลิตอาหารสัตว์เนื่องจากถั่งเช่าสีทองสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยในทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวได้คือ เอนไซม์อะไมเลส เพคตินเนส เบต้ากลูคาเนส เอนโดกลูคาเนส เซลลูเลส โปรติเอส และไฟเตส [3] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือ คอร์โดเซปิน (*Cordycepin*) และอะดีโนซีน (adenosine) ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพของถั่งเช่าสีทองที่สำคัญคือ เสริมสร้างสมรรถนะทางเพศ ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก เสริมระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ลดไขมันในเส้นเลือด ป้องกันและบรรเทาอาการเบาหวาน ด้านเชื้อเอส โรค

มาลาเรีย ลดอาการเหนื่อยล้า ป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ ไต และปอด [4]

ถั่งเช่าเป็นราแมลง (Entomofungus) จัดอยู่ในอาณาจักร (Kingdom) ฟันไจ ชั้น (Class) แอสโคไมยซีเทส ชนิด (Species) คอไรโดเซพ มิริทารีส ซึ่งจะมีสโตรมา (Stromata) รูปร่างคล้ายกระบองตั่งตรงมองคล้ายกับทำยีนของทหาร มีสีส้ม ราแมลงในกลุ่มนี้ถือว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างยิ่ง [4] วงชีวิตของถั่งเช่า เริ่มจากเมื่อราแมลงได้ล่องล้าเข้าไปในวงจรชีวิตของแมลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่สปอร์ราตกลง บนตัวแมลงหรือจากการที่แมลงกินอาหารที่ปนเปื้อนราเข้าไป เส้นใยของราจะฝังตัวเข้าสู่อวัยวะภายในและเจริญเติบโตอยู่ในตัวแมลงโดยการกินอาหารจากตัวแมลงนั้น ราที่เป็นปรสิตนี้จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจนสามารถเข้าไปแทนที่อยู่ในลำตัวของแมลงนั้นทั้งตัวและกลายเป็นกลุ่มเส้นใยของราหรือไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยของราแมลงที่เจริญเติบโตรวมตัวกันจะเกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่แทงก้านออกมาจากตัวแมลง จะมีรูปร่างและสีที่แตกต่างกัน เช่น ก้านสปอร์ราที่เหมือนกิ่งไม้ หรือเหมือนดาวยาคลุ่มตัวแมลง ก้านสปอร์เหล่านี้พร้อมที่จะกระจายไปตกบนแมลงตัวต่อไป [5]

ถั่งเช่าสีทองมีการเพาะกันเป็นการค้ามานานกว่าสิบปีที่ประเทศจีน เช่น บริษัทเจียวสุเจียงหนาน และที่อเมริกา เช่น บริษัทไปโอเกน สำหรับประเทศไทยข้อมูลเกี่ยวกับถั่งเช่ามีน้อยมาก บางคนไม่รู้จักถั่งเช่ามาก่อนเลย เมื่อปี 2553 นายแพทย์สมยศ กิตติมั่นคง ได้เสนอข่าวเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าว่ามีสรรพคุณที่มีฤทธิ์เพิ่มสมรรถนะทางเพศทำให้ถั่งเช่าเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น [6] ดร.อานนท์ เอื้อตระกูล ได้นำเสนอใน

เว็บไซต์ว่า ได้ศึกษารวบรวมสายพันธุ์และผลิตเส้นใยถั่งเช่าสีทองส่งออกไปจำหน่ายที่ยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น และออสเตรเลียมานานนับสิบปี [7] ในปีเดียวกัน ัญญา ทะพิงค์แก ได้เปิดอบรมการเพาะถั่งเช่าเป็นแห่งแรกในประเทศไทย ที่สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ [8] และได้ทดลองเพาะเห็ดสกุลคอไรโดเซพ โดยวิธีควบคุมการปนเปื้อนด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งใช้เทคนิคและอุปกรณ์แบบง่ายที่ราคาไม่สูงและได้เผยแพร่งานวิจัยนี้ในช่วงปี 2554 [9] ในปีเดียวกันกองวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ส่วนการศึกษา โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า ได้ส่งนักเรียนนายร้อยที่สนใจทำงานวิจัยถั่งเช่าสีทองไปอบรมและกลับมาทำวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดสกุลถั่งเช่า (*I. tenuipes* (Peck.)) และในปี พ.ศ. 2557 นักเรียนนายร้อยได้นำข้อมูลเสนอแนะ ในงานวิจัยของรุ่นพี่มาศึกษาและได้สานต่องานวิจัยในหัวข้อเรื่อง การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใย *C. militalis* (L.) Link แต่ด้วยประสบการณ์ ความชำนาญ และข้อมูลต่างๆ ยังมีไม่มากทำให้การวิจัยสามารถเพาะเลี้ยงเส้นใยให้พัฒนาเป็นตุ่มดอกได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้พัฒนาเป็นดอกที่สมบูรณ์ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงค้นคว้าข้อมูลต่างๆ ทำให้พบว่า ถั่งเช่ามีความแปรปรวนค่อนข้างสูงเนื่องจากเป็นเส้นใยมีหลายนิวเคลียส ดังนั้นโอกาสที่จะออกดอกจะต้องมีเส้นใยที่ต่างขั้วกันมารวมกันจึงจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ [5] และจากการทดลองของ Sung et al. [10] พบว่าการเก็บเส้นใยเชื้อ ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะสามารถเก็บได้นานถึง 6 เดือน แต่ถ้าเก็บในอาหารเหลว

สามารถเก็บได้ถึง 1 ปี และถ้าทำการต่อเชื้อตั้งแต่ 2 ครั้งขึ้นไปจะมีโอกาสแปรปรวน คือสีเปลี่ยนไป และไม่ค่อยออกดอก นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงถึงเชื้อสีทองยังต้องคำนึงถึง สายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สูตรอาหารเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ แสง โดยเฉพาะแสงมีผลต่อความหนาแน่น (Density) เนื้อ (Texture) การเกิดสี (Pigmentation) ของเส้นใยที่เพาะ และปริมาณคอร์โดเซปิน กับ อะดีโนซีน จากข้อมูลข้างต้นร่วมกับข้อมูลความต้องการทางตลาดของถึงเชื้อสีทองยังสูง ในขณะที่ประเทศไทยยังมีผู้เพาะถึงเชื้อสีทองไม่มาก ผู้วิจัยได้ข้อมูลจากลุงหยุด แซ่มะประเสริฐ เจ้าของฟาร์มเห็ด อ.วิหารแดง จ.สระบุรี เกี่ยวกับราคาของถึงเชื้อสีทองชนิดอบแห้งในปัจจุบันขายที่ราคากิโลกรัมละ 60,000 บาท หรือสูงถึง 100,000 ในบางฟาร์มที่สามารถผลิตถึงเชื้อสีทองซึ่งให้สารสำคัญทางยาสูงๆ ร่วมกับความต้องการต่อยอดงานวิจัยเดิม เรื่องการเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยถึงเชื้อสีทอง (*C. militaris*) ซึ่งใช้เมล็ดข้าวสังข์หยด เมล็ดถั่วแดง เมล็ดลูกเดือย เมล็ดถั่วเหลือง และเมล็ดข้าวโพด พบว่าเมื่อใช้เมล็ดลูกเดือยเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงพบการเจริญของเส้นใยเป็นตุ่มดอกและพัฒนาเป็นดอกได้ดีกว่า เมล็ดธัญพืชชนิดอื่นๆ แต่ยังประสบปัญหาการพัฒนาเป็นดอกไม่สมบูรณ์ส่วนใหญ่การเจริญจะหยุดชะงักอยู่ที่ระยะเป็นตุ่มดอก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับถึงเชื้อสีทองต่อไป ในหัวข้อการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถึงเชื้อสีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *C. militalis* บนเมล็ดธัญพืช

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถึงเชื้อสีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *C. militaris* บนเมล็ดธัญพืช

3. ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ T-test แบ่งการทดลองเป็น 2 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 7 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยทดลองใช้อาหารเพาะเลี้ยง 50 ขวด ซึ่งมีขอบเขตในการศึกษาดังนี้ แยกเชื้อเริ่มต้นจากถึงเชื้อสีทอง (*C. militaris*) ที่ขอนแก่นเคราะห์จากฟาร์มเห็ดที่สระบุรีและอ่างทอง จากนั้นขยายให้เพิ่มจำนวนในอาหารเหลว (Potato Dextrose Broth: PDB) และอาหารแข็ง (Potato Dextrose Agar: PDA) แล้วถ่ายหัวเชื้อเหลว และหัวเชื้อแข็งลงอาหารเพาะที่มีเมล็ดธัญพืชเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุมสภาวะปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมเพื่อให้พัฒนาดอกเห็ด ส่วนการตรวจและบันทึกผลการทดลอง ได้แก่

3.1 สังเกตระยะเวลาที่เส้นใยเจริญเต็มผิวน้ำอาหารเพาะ

3.2 ระยะเวลาการพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก

3.3 ระยะเวลาการพัฒนาของตุ่มดอกเป็นดอก

3.4 น้ำหนักสดและแห้งต่อหนึ่งขวดเพาะเลี้ยง

3.5 วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Two sample T-test โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การแยกเชื้อเริ่มต้นจากถังเช่าสีทอง (*C. militaris*) ที่ขอนแก่นเคราะห์มาจากฟาร์มเห็ดที่สระบุรีและอ่างทอง มีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 นำถังเช่าสีทองมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เพาะเลี้ยงบนอาหารฟิตีเอ ซึ่งประกอบด้วยมันฝรั่ง ยีสต์สกัด เปปโตน กลูโคส รุน และน้ำกลั่น

4.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 30 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหารสามารถใช้เป็นหัวเชื้อแข็งได้

4.2 การขยายเชื้อเริ่มต้นให้เพิ่มจำนวนเพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเหลว มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 นำเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารฟิตีเอ มาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Flask) ที่มีอาหารเหลวฟิตีเอ ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง ยีสต์สกัด เปปโตน กลูโคส และน้ำกลั่น

4.2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 ต่อ นาที ในที่มืด เป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน

4.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง มีขั้นตอนดังนี้

4.3.1 ใส่เมล็ดลูกเต๋อย 35 กรัม ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 480 มิลลิลิตร

4.3.2 เตรียมสารละลายอาหารเสริม โดยเตรียมมันฝรั่งให้เป็นลูกเต๋าละเล็ๆ 200 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนมันฝรั่งนิ่ม จากนั้นกรองเอาแต่ส่วนน้ำไว้

4.3.3 ต้มไข่ 2 ฟอง แล้วนำไปปั่นจนละเอียดในเครื่องปั่นที่เติมน้ำต้มมันฝรั่งลงไปเล็กน้อย

4.3.4 นำหนอนใหม่ 400 กรัมต่อลิตร ใส่ในเครื่องปั่น แบ่งน้ำต้มมันฝรั่งบางส่วนใส่ลงไปปั่นจนละเอียด จากนั้นแยกส่วนต่อมใหม่ (silk grand) ที่มีลักษณะเป็นเส้นสีเหลืองออก

4.3.5 เติมน้ำผสมอื่นๆ ได้แก่ ไคไฮโดรเจนโพแทสเซียม-ฟอสเฟต 0.5 กรัม กลูโคส 20 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม เปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 10 กรัม วิตามินบี 1 จำนวน 4 เม็ด ผสมให้เข้ากันโดยละลายในน้ำมันฝรั่ง ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.3.6 นำส่วนสารละลายอาหารเสริมที่เตรียมได้จากข้างต้นเติมลงในขวดลูกเต๋อยประมาณ 45 มิลลิลิตร ปิดฝาที่เจาะรูตรงกลางแล้วจุกด้วยสำลี

4.3.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 25-30 นาที

4.4 การถ่ายหัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งลงอาหารเพาะ มีขั้นตอนดังนี้

4.4.1 สำหรับหัวเชื้อเหลวใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดหัวเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเพาะ

4.4.2 สำหรับหัวเชื้อแข็งให้ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยที่เจาะจุกคอorkขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 มิลลิเมตร ใส่ลงในขวดอาหารเพาะประมาณ 5 ชิ้น

4.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในที่มืดจนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร

4.4.4 เริ่มให้แสงความเข้มแสง 1000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน ปรับอุณหภูมิลดลงที่ 17 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 70-80 เพื่อกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอก และดอกต่อไป

4.5 การเก็บเกี่ยวผลผลิต มีขั้นตอน ดังนี้

4.5.1 สเปรย์แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อบริเวณที่จะทำการเก็บถั่วงอกแช่สีทอง ส่วนอุปกรณ์อื่นๆ ให้ผ่านการฆ่าเชื้อและอบให้แห้ง

4.5.2 เปิดฝาขวดเพาะเลี้ยง แล้วใช้ปากคีบอย่างยาว แคะผลผลิตออกมาทั้งชิ้น แล้ววางบนภาชนะที่เตรียมไว้

4.5.3 ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วค่อยๆ ดึงบริเวณก้านถั่วงอกออกมาวางในภาชนะที่สะอาด โดยดึงบริเวณก้านถั่วงอกให้ถึงโคนต้นหรือให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์

4.5.4 ทำการแยกวัสดุเพาะที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวถั่วงอกแช่สีทองออกวางลงในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

4.5.5 ทำการอบถั่วงอกแช่สีทอง และวัสดุเพาะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยก้านถั่วงอกแช่สีทองใช้เวลาในการอบ 24 ชั่วโมง และวัสดุเพาะถั่วงอกแช่สีทองใช้เวลาในการอบ 48 ชั่วโมง เพื่อให้มีความชื้นน้อยที่สุด

4.5.6 หลังจากนำออกจากตู้อบแล้ว ให้เก็บผลผลิตไว้ในภาชนะที่สามารถป้องกันความชื้นได้หรือเก็บไว้ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพสุญญากาศ

4.5.7 เก็บผลผลิตไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์หรือเพื่อวิเคราะห์สารทางยาต่อไป

4.6 การเตรียมถั่วงอกแช่สีทองเพื่อส่งวิเคราะห์สารสำคัญทางยา มีขั้นตอน ดังนี้

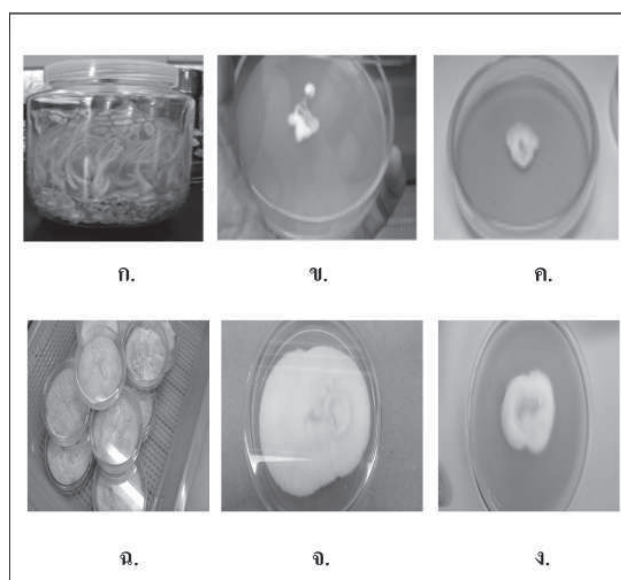
4.6.1 นำถั่วงอกแช่สีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเหลว จำนวน 50 ขวด โดยเลือกจากขวดที่มีการเจริญสม่ำเสมอ มีสีส้มเข้ม ความยาวมากกว่า 4 เซนติเมตร มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร และร่อนให้เป็นผงละเอียดด้วยตะแกรกร่อนที่มีความละเอียด 100 เมท (Mesh)

4.6.2 นำถั่วงอกแช่สีทองบดละเอียดประมาณ 10 กรัม ใส่ขวดสีชา และนำส่งวิเคราะห์สารทางยา

4.6.3 นำถั่วงอกแช่สีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยหัวเชื้อแข็ง จำนวน 50 ขวด ทำซ้ำตามข้อ 4.6.1-4.6.2

5. ผลการวิจัย

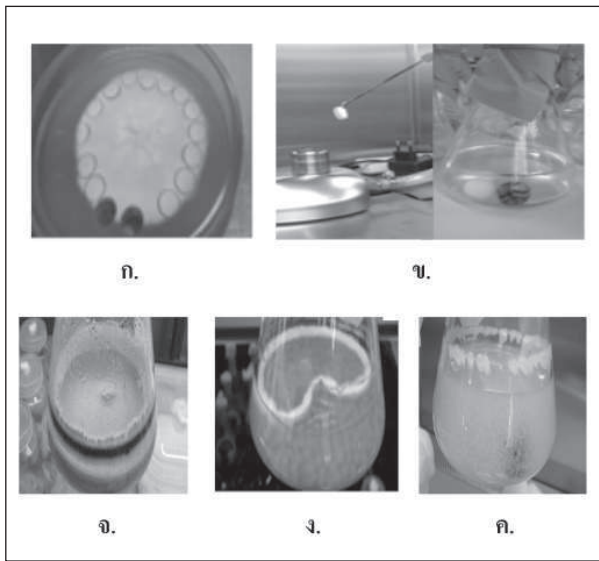
5.1 ผลการแยกเชื้อต้นต่อจากถั่วงอกแช่สีทอง (*C. militaris*) ใช้ระยะเวลาประมาณ 30 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร และนำเชื้อเริ่มต้นนี้ไปเป็นหัวเชื้อแข็งและถ่วงลงอาหารเหลวเพื่อเป็นหัวเชื้อเหลว ต่อไป ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การเจริญของเส้นใยหลังการเชื้อจากถั่วงอกแช่สีทอง

- ก. ถั่วงอกแช่สีทอง ข. เส้นใยอายุ 8 วัน
- ค. เส้นใยอายุ 14 วัน
- ง. เส้นใยอายุ 21 วัน
- จ. เส้นใยอายุ 30 วัน
- ฉ. เส้นใยหลังการให้แสง

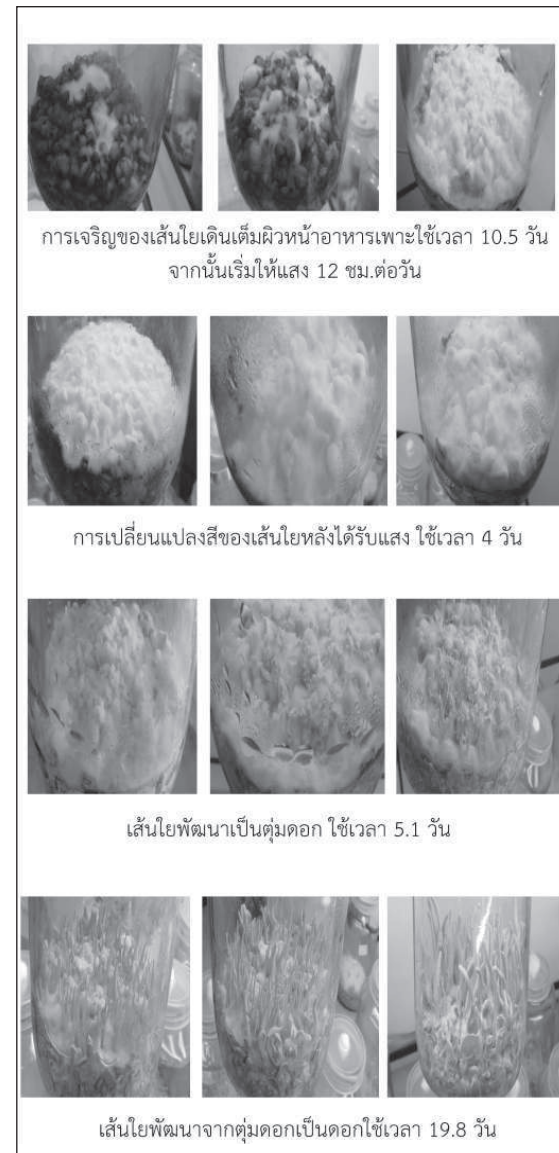
5.2 ผลการขยายเชื้อเริ่มต้นให้เพิ่มจำนวน เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อเหลว พบการเจริญเติบโต ของเส้นใยเต็มอาหารเหลวใช้เวลาประมาณ 4.3 วัน ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การขยายเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว

- ก. เส้นใยเชื้อตัดเป็นชิ้นเล็กๆ
- ข. ย้ายใส่ในอาหารเหลว
- ค. เส้นใยอายุ 3 วัน
- ง. เส้นใยอายุ 5 วัน
- จ. เส้นใยหลังการให้แสง

5.3 ผลการเจริญเติบโตหลังจากถ่ายหัวเชื้อ เหลวลงอาหารเพาะ พบว่าเส้นใยเจริญเต็มผิว หน้าอาหารใช้เวลา 10.5 วัน จากนั้นเริ่มให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน เส้นใยจะเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็น สีเหลืองปนสีส้มใช้เวลา 4 วัน จากนั้นเส้นใยจะ พัฒนาเป็นตุ่มดอกใช้เวลา 5.1 วัน และพัฒนาจาก ตุ่มดอกเป็นดอกใช้เวลา 19.8 วัน ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตของเส้นใยแต่ละระยะหลังจากถ่ายหัวเชื้อเหลวลงอาหารเพาะ

5.4 ผลการเจริญเติบโตหลังจากถ่ายหัวเชื้อ
แข็งลงอาหารเพาะ พบว่าเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้า
อาหารใช้เวลา 28.2 วัน จากนั้นเริ่มให้แสง 12
ชั่วโมงต่อวัน เส้นใยจะเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสี
เหลืองปนสีส้มใช้เวลา 4 วัน จากนั้นเส้นใยจะ
พัฒนาเป็นตุ่มดอกใช้เวลา 5.4 วัน และพัฒนา
จากตุ่มดอกเป็นดอกใช้เวลา 29.3 วัน ดังภาพ
ที่ 4



ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของเส้นใยแต่ละระยะ
หลังจากถ่ายหัวเชื้อแข็งลงอาหารเพาะ

5.5 ผลการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่
สีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ
C. militaris พบว่าระยะเวลาการพัฒนาของ
เส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเพาะ ระยะเวลา
เส้นใยเปลี่ยนสี ระยะเวลาที่เส้นใยพัฒนาเป็น
ตุ่มดอก และระยะเวลาที่ตุ่มดอกพัฒนาเป็นดอก
สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระยะเวลาการพัฒนาของเส้นใยเจริญเต็ม
ผิวหน้าอาหารเพาะ ระยะเวลาเส้นใยเปลี่ยนสี
ระยะเวลาที่เส้นใยพัฒนาเป็นตุ่มดอก และระยะ
เวลาที่ตุ่มดอกพัฒนาเป็นดอก

ชนิด ของหัว เชื้อ	ระยะเวลา เส้นใยเจริญ เต็มผิวหน้า อาหาร (วัน)	เส้นใย เปลี่ยนสี (วัน)	การ พัฒนา เส้นใยเป็น ตุ่มดอก (วัน)	กาพัฒนา ตุ่มดอก เป็นดอก (วัน)
เหลว*	44.8 (10.5)	48.8 (4)	53.9 (5.1)	73.7 (19.8)
แข็ง**	58.2 (28.2)	62.3 (4)	67.7 (5.4)	97 (29.3)

หมายเหตุ: * หัวเชื้อเหลวใช้เวลาตั้งแต่เพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ
เริ่มต้น 30 วัน และถ่ายเชื้อลงอาหารเหลวอีก
4.3 วัน รวมเป็น 34.3 วัน
** หัวเชื้อแข็งใช้เวลาตั้งแต่เพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ
เริ่มต้น 30 วัน
(-) คาในวงเล็บคือช่วงระยะเวลาที่ไม่ได้นับ
รวมตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น

5.6 ผลของการเก็บเกี่ยวผลผลิต พบว่า
เมื่อเก็บถึงเชื้อสืทองแล้วต้องนำไปผึ่งลมให้แห้ง
ประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปอบความร้อนที่
50 องศาเซลเซียส มิฉะนั้นเชื้อสืทองจะคายน้ำ
ออกมาทำให้เมื่อนำไปอบแห้งจะมีสีคล้ำ
ไม่สวย ถึงเชื้อสืทองก่อนและหลังอบความร้อนแสดง
ดังภาพที่ 5 ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง
สรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักสดและแห้งต่อหนึ่งขวดเพาะเลี้ยง

ชนิดหัวเชื้อ	น้ำหนักสดต่อหนึ่งขวด เพาะเลี้ยง (กรัม)	น้ำหนักแห้งต่อหนึ่งขวด เพาะเลี้ยง (กรัม)
หัวเชื้อเหลว	46.18	9.43
หัวเชื้อแข็ง	40.18	7.39



ภาพที่ 5 ถึงเชื้อสืทองก่อนและหลังอบความร้อน

5.7 ผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางยา
พบว่าในการส่งวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางยา
ที่กองพัฒนายาแผนไทยและสมุนไพร กรมพัฒนา
การแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก
กระทรวงสาธารณสุข ทั้งสองตัวอย่าง ซึ่งได้แก่
ตัวอย่างถึงเชื้อสืทองที่เพาะเลี้ยงจากหัวเชื้อ
เหลว และหัวเชื้อแข็ง สามารถวัดค่าคอร์ไดเซปิน
ได้ 825, 313 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ
และ สามารถวัดค่าอะดีโนซีน ได้ 167, 110
มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ดังภาพที่ 6-7

Specimen Sample : Cordyceps

Sample Characteristic :
and Condition

Product Name	Batch No.	Sample Type	Packing	Quantity
ตัวอย่าง A	-	ผง สีน้ำตาลแดง	หลอดแก้ว	10 กรัม

Characterization Method : High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Received Date : August 28, 2015

Test Date : September 8, 2015

Analysis Results

Sample Name	cordycepin (mg/100g)	adenosine (mg/100g)
ตัวอย่าง A	825	167


 (Witoon Youngsa-ad)
 Analyst

ภาพที่ 6 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางยาตัวอย่างที่ 1

Specimen Sample : Cordyceps

Sample Characteristic :
and Condition

Product Name	Batch No.	Sample Type	Packing	Quantity
องุ่นสีทอง	-	ผง สีน้ำตาลแดง	หลอดแก้ว	10 กรัม

Characterization Method : High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Received Date : October 9, 2015

Test Date : October 14, 2015

Analysis Results

Sample Name	cordycepin (mg/100g)	adenosine (mg/100g)
องุ่นสีทอง	313	110


 (Witoon Youngsa-ad)
 Analyst

ภาพที่ 7 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางยาตัวอย่างที่ 2

6. สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงถึงเข้าสู่สีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวให้ผลการเจริญของเส้นใย และผลผลิตดีกว่าหัวเชื้อแข็ง ส่วนแม่เชื้อหรือเชื้อเริ่มต้นนั้นแยกได้จากราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพีดีเอ (PDA) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของธัญญา และคณะ ที่ได้สรุปหลักในการเพาะเห็ดถึงเข้าไว้ 4 ขั้นตอน คือ คัดแยกแม่เชื้อหรือเชื้อเริ่มต้น ขยายแม่เชื้อให้เพิ่มจำนวนในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งแล้วแต่การใช้งานซึ่งการขยายเชื้อในอาหารแข็งใช้ระยะเวลามากกว่า การย้ายลงอาหารเพาะเลี้ยงและการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยง [11]

ในงานวิจัยนี้ใช้เมล็ดลูกเต๋อยเป็นแหล่งคาร์บอนและผสมสารละลายอาหารเสริมซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง เปปโตน วิตามินบี 1 แมกนีเซียมซัลเฟต ไตไฮโดรเจนโพแทสเซียมฟอสเฟต ยีสต์สกัด กลูโคส ไข่ หนอนไหม และน้ำกลั่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธัญญา และคณะ ที่ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์ไดเซปินในถังเข้าสู่สีทองพบว่าข้าวขาว ข้าวซ้อมมือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวบาร์เลย์ และลูกเต๋อย เหมาะที่จะเป็นแหล่งให้คาร์บอนแก่ถังเข้าสู่สีทอง ส่วนสารละลายอาหารเสริมนั้นมีการปรับเพิ่มและลดปริมาณแต่ละชนิดของสารที่ใช้โดยศึกษาจากงานวิจัยของธัญญา และคณะ [3] พรหมงคล และคณะ [12] และทรงชัย และคณะ [13] เป็นแนวทาง ส่วนการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิควรอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียส ยกเว้นช่วงกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกควรปรับอุณหภูมิเป็น 17 องศาเซลเซียส ความชื้น 60-70 เปอร์เซ็นต์ แสง 1000 ลักซ์ ประมาณ 12 ชั่วโมงต่อวัน นั้น

สอดคล้องกับ Shrestha, et. al. [5] ที่ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ *C. militaris* ที่มีคุณสมบัติเป็นยา และได้กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิควรอยู่ช่วงไม่สูงเกิน 25 องศาเซลเซียส และช่วงที่จะพัฒนาเป็นตุ่มดอกควรอยู่ระหว่าง 18-22 องศาเซลเซียส แสง 500-1000 ลักซ์ 12 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้น 70-90 เปอร์เซ็นต์

สำหรับหัวเชื้อเหลวเมื่อถ่ายลงอาหารเพาะระยะเวลาของเส้นใยเดินเต็มอาหาร การเปลี่ยนสีของเส้นใยจากสีขาวเป็นสีส้ม การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการพัฒนาของตุ่มดอกเป็นดอก เมื่อเริ่มนับตั้งแต่ขั้นตอนการแยกเชื้อจากแม่เชื้อหรือเชื้อต้นต่อ พบว่าใช้เวลา 44.8, 48.8, 53.9, และ 73.7 วัน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธัญญา และคณะ [3] ที่ศึกษาผลของวิธีการเพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดธัญพืชที่แตกต่างกัน 10 ชนิดต่อการผลิตสารคอร์โดเซปินในถังเช่าสีทอง พบว่า ใช้ระยะเวลา 21 วันในการเตรียมเชื้อ จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหารเหลวใช้เวลาอีก 14 วัน และถ่ายหัวเชื้อเหลวลงอาหารเพาะใช้เวลาอีก 14 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร (ดังนั้นสรุปใช้เวลารวมตั้งแต่เตรียมหัวเชื้อถึงเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าเป็นเวลา 49 วัน) และสามารถตรวจพบสารคอร์โดเซปินได้ตั้งแต่ระยะเส้นใย น้ำหนักสดและแห้งจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้เพาะ และจะเริ่มคงที่หลังจากเพาะไปได้ประมาณ 56-70 วัน ดังนั้นในการเพาะถังเช่าจะใช้ระยะ เวลาตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นจนถึงออกดอกประมาณ 70 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้หัวเชื้อเหลวในงานวิจัยนี้ ส่วนหัวเชื้อแข็งเมื่อถ่ายลงอาหารเพาะระยะเวลาของเส้นใยเดินเต็มอาหาร การเปลี่ยนสีของเส้นใยจากสีขาวเป็นสีส้ม การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการ

พัฒนาของตุ่มดอกเป็นดอก เมื่อเริ่มนับตั้งแต่ขั้นตอนการแยกเชื้อจากแม่เชื้อหรือเชื้อเริ่มต้น พบว่าใช้เวลา 58.2, 62.3, 67.7, และ 97 วัน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชัยวัฒน์ จันบำรุง [14] ที่ศึกษาเลี้ยง *C. militaris* (L.) Link บนอาหารแข็งแล้วนำไปถ่ายหัวเชื้อต่อบนอาหารเพาะที่มีเมล็ดลูกเดือยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าระยะเวลาของเส้นใยเดินเต็มอาหาร การเปลี่ยนสีของเส้นใยจากสีขาวเป็นสีส้ม การพัฒนาของเส้นใยเป็นตุ่มดอก และการพัฒนาของตุ่มดอกเป็นดอก ใช้เวลา 57, 59, 63, และ 70 วันตามลำดับ ซึ่งช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกัน

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางยา ตัวอย่างที่ 1 เก็บจากถังเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเหลว และตัวอย่างที่ 2 เก็บจากถังเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยหัวเชื้อแข็ง สามารถวัดค่าคอร์โดเซปินได้ 825 และ 313 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และ สามารถวัดค่าอะดีโนซีนได้ 167 และ 110 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการสืบค้นเอกสารวิจัยส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องถึงถังเช่าสีทองในปัจจุบันนี้มักจะวิจัยกันในลักษณะการเพาะด้วยอาหารเหลวได้ผลผลิตเป็นเส้นใย [15][16] บางงานวิจัยได้ผลผลิตเป็นถังเช่าสีทอง [3][17] และมักจะพบรายงานการวัดปริมาณสารสำคัญทางยา 2 ตัว คือ คอร์โดเซปิน และอะดีโนซีน เช่นรายงานของ ธัญญา และคณะ, Huang, et. al., Ting, et. al., และ Masuda, et. al. นอกจากนี้ยังพบว่างานวิจัยของ ธัญญา และคณะ ที่ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงถังเช่าสีทองและนำไปอบแห้งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินได้ประมาณ 824.332 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ ส่วนผลวิเคราะห์สารสำคัญทางยาตัวอย่างที่ 2 ลดลงอาจเนื่อง

มาจากระยะเวลาของการเจริญจากเส้นใยเป็นดอกใช้เวลานานถึง 97 วัน แต่ตัวอย่างที่ 1 ใช้เวลา 73 วัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธัญญาและคณะ [3] ที่ได้รายงานผลวิจัยของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์ไดเซปินในถังเช่าสีทอง พบว่าผลผลิตและปริมาณคอร์ไดเซปินจะสูงสุดหลังจากการเพาะไปได้ 56-70 วัน (สัปดาห์ที่ 8-10) ซึ่งเป็นระยะที่ดอกเห็ดพัฒนาอย่างเต็มที่แล้ว หลังจากนั้นปริมาณคอร์ไดเซปินจะเริ่มลดลง

7. กิตติกรรมประกาศ

ในการดำเนินการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยและพัฒนาโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า (กทพ.ร.ร.จปร.) และความช่วยเหลือจากครอบครัว ตลอดจนฟาร์มเห็ดจังหวัดสระบุรี เจ้าหน้าที่ของกองวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

บรรณานุกรม

- (1) Gu, Y.X., Wang, Z.S., Li, S.X., and Yuan, Q.S., 2007. Effect of multiple factor on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry*, 102(4): 1304-1309.
- (2) Zhao, J., Xie, J., Wang, L.Y., and Li, S.P., 2014. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87: 27-289.
- (3) ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย, ศุภชัย ศรีจิวงค์, กัญจน์พัชร อุปลศิลป์, อภิรดา พรบัณณวิญญ์, อภิษฎา ทองทับ และ วรณพร ทะพิงค์แก, 2557. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดสมุนไพรถังเช่าสีทอง และการนำไปใช้ประโยชน์. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่. 119 หน้า.
- (4) Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A., and Sakakibara, M., 2010. Medicinal use of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fittoterapia*, 81(8): 961-968.
- (5) Shrestha, B., Zhang, w., Rhang, Y., and Liu, X., 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycol Progress*, 11:599-614.
- (6) สมยศ กิตติมั่นคง, 2553. ไทยเพาะถังเช่าได้. ไทยรัฐ, (30 มกราคม 2553):1.
- (7) อานนท์ เอื้อตระกูล, 2553. เห็ดถังเช่าสีทองเพาะได้ในไทยมาหลายสิบปีแล้ว. (Online) http://www.anon-biotec.com/Dong_Chong/Dong_Chong_02.html. (15 ตุลาคม 2558)
- (8) ธัญญา ทะพิงค์แก, 2553. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการเพาะเห็ดถังเช่า รุ่นที่ 1. สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่, 45 หน้า.
- (9) ธัญญา ทะพิงค์แก, 2554. การทดลองเพาะเห็ดสกุลคอร์ไดเซฟโดยวิธีควบคุมการปนเปื้อนด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์. บทคัดย่อการนำเสนอผลงานแบบบรรยายและโปสเตอร์ การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏ ครั้งที่ 2 วันที่ 14-17 มกราคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก, 310 หน้า.

- (10) Sung, J.M., Park, Y.J., Lee, J.O., Han, S.K., Lee, W.H., Choi, S.K., and Shrestha, B., 2006. Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro. *Mycobiol*, 34(4):196-199.
- (11) ธัญญา ทะพิงค์แก, 2555. การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ. กรุงเทพฯ: บริษัททูโฟร์ฟรันดิง, 93 หน้า.
- (12) พรหมงคล สุขเกษม, วรณรัตน์ กิจดี, พงษ์วัฒน์ เสือพลี, และณัฐนันท์ จิตต์ศิริ, 2554. การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเห็ดสกุลถั่งเช่า (*Isaria tenuipes*). ปรินูญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า, นครนายก, 75 หน้า.
- (13) ทรงชัย สีโชติ, ธนกฤต แก้วถาวร, ชินวัฒน์ บุญเมือง, วิฑูร รุฬทรัพย์สกุล, วรรณธร ระฤกชาติ, และ เสกสรร โชคพัฒนกิจ, 2556. การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris*. ปรินูญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า, นครนายก, 102 หน้า.
- (14) ชัยวัฒน์ จันบำรุง, 2555. การเลี้ยงเชื้อเลี้ยง *Cordyceps militaris* (L.) Link ด้วยเมล็ดธัญพืช, ปรินูญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม. 40 หน้า.
- (15) Huang, L., Li, Q., chen, Y., Wang,X., and Zhau, X. 2009. Determination and cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. *Microbiology Research*, 3(12): 957-961.
- (16) Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, a., Sakakibara, M. 2006. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial technology*, 39:641-646.
- (17) Ting-chi Wen, Guang-rong Li, Ji-chuan Kang, Chao Kang, and Kevin D. Hyde. 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. *Chiang Mai J.sci.*, 41(4):858-872.