

การปรับปรุงการเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* โดยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มี
ข้าวเป็นองค์ประกอบ

IMPROVEMENT OF *Cordyceps militaris* LINK CULTIVATION ON RICE

ชूरีพร	ดวงแก้ว
ธนัษพร	หวานชะเอม
ธีรน้อย	เปลี่ยนสกุล

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การปรับปรุงการเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* โดยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มี
ข้าวเป็นองค์ประกอบ

IMPROVEMENT OF *Cordyceps militaris* LINK CULTIVATION ON RICE



ชूरีพร

ดวงแก้ว

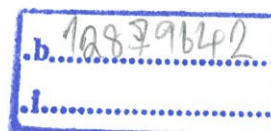
ธน์ชพร

หวานชะเอม

ธีรน้อย

เปลี่ยนสกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....**149025**
วัน,เดือน,ปี.....**27.S.A. 2560**



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

IMPROVEMENT OF *Cordyceps militaris* LINK CULTIVATION ON RICE

CHUREEPORN

DUANGKAEW

TANUTCHAPORN

VANCHAEM

TEERANAI

PLIANSAKUL

A SPECIAL PROJECT IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF
SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงการพิเศษ การปรับปรุงการเพาะเลี้ยง *Cordyceps militaris* โดยการใช้อาหารที่มี
ข้าวเป็นองค์ประกอบ

ชื่อนักศึกษา Improvement of *Cordyceps militaris* Link cultivation on rice
นางสาวชวีพร ดวงแก้ว รหัส 55051078
นางสาวธันชพร หวานชะเอม รหัส 55051100
นายธีรณัย เปลี่ยนสกุล รหัส 55051105

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา ชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.อารี ฤทธิบุรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ประธานกรรมการ	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล คณะกรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ คณะกรรมการ	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การปรับปรุงการเพาะเลี้ยง <i>Cordyceps militaris</i> โดยการใช้อาหารที่มีข้าวเป็นองค์ประกอบ		
	Improvement of <i>Cordyceps militaris</i> Link cultivation on rice		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชวีพร	ดวงแก้ว	รหัส 55051078
	นางสาวธน์ชพร	หวานชะเอม	รหัส 55051100
	นายธีรณัย	เปลี่ยนสกุล	รหัส 55051105
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อารี ฤทธิบุรณ์		

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาเพื่อปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากการหาอัตรา การเจริญเติบโตของหัวเชื้อ พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองจะเข้าสู่ระยะเจริญทวีคูณในช่วงเวลาที่ 48 และเมื่อทำ การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ นมผง ไข่ไก่ และกากถั่วเหลือง แทนการใช้เปปโตเนนและยีสต์สกัดพบว่า การใช้นมผงให้ปริมาณอะดีโนซีนมากที่สุดคือ 140.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และการใช้ไข่ไก่ให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุดคือ 67.61 ไมโครกรัมต่อ มิลลิตร ซึ่งให้ปริมาณสารที่มากกว่าการใช้เปปโตเนนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน พร้อมทำการ ทดสอบการสกัดสารด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงพบว่า การสกัดโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้สารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินมากกว่าการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่น เสียงความถี่สูงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเราสามารถให้ ไข่ไก่และนมผงแทนการใช้เปปโตเนนและยีสต์สกัดในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้สารคอร์โด เซปินและอะดีโนซีนในปริมาณสูง

คำสำคัญ: ไข่ไก่ คอร์โดเซปิน น้ำบริสุทธิ์สูง นมผง เห็ดถั่งเช่าสีทอง อะดีโนซีน

Title	Improvement of <i>Cordyceps militaris</i> Link cultivation on rice		
Student	Miss. Chureeporn	duangkaew	student ID 55051078
	Miss.Tanutchaporn	vanchaem	student ID 55051100
	Mr. Teeranai	pliansakul	student ID 55051105
Degree	Bachelor of science in Biotechnology		
Department	Biology		
Academic year	2015		
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon		

Abstract

This special project studies in improvement of *Cordyceps militaris* cultivation. This research shows *Cordyceps militaris* has an initial log phase at 48h. Then culturing it on medium used replaced peptone and yeast extract with egg, milk powder and soybean meal as nitrogen sources. The result presents using milk powder provides the highest adenosine at 140.27 $\mu\text{g/ml}$ and egg provides the highest cordycepin at 67.61 $\mu\text{g/ml}$. They are more effective than using peptone and yeast extract. And considering extraction with ultrapure water at 50⁰C with two options showed incubated in water bath for 4 hour provide cordycepin and adenosine higher than ultrasonicated for 30 minutes. This special project shows the best cultivation by using milk powder or egg as nitrogen source of medium for low cost production and high quality *Cordyceps militaris* production.

Keyword: egg, cordycepin ,ultrapure ,milkpowder, cordyceps militaris , adenosine

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากหลายบุคคล

ขอขอบคุณ รศ.อารี ฤทธิ์บุญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่กรุณาให้ความรู้ความช่วยเหลือและแนะนำให้แนวทางที่เป็นประโยชน์ แก่ไขข้อบกพร่องต่างๆของโครงการพิเศษ เป็นผู้สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดการทำโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในโครงการพิเศษนี้ ให้เรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาและให้ความรู้เกี่ยวกับเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงรวมถึงการแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการพิเศษนี้ ให้เรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และจริยธรรมตลอดจนหน้าที่ความรับผิดชอบ

ขอขอบคุณพี่ศันสนีย์ ภูประกิจ นักศึกษาปริญญาโทที่คอยให้ความช่วยเหลือจนโครงการพิเศษฉบับนี้เรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวก จัดเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ สารเคมี ที่ใช้ในการทดลองนี้

ขอขอบคุณร้านธนิ อาหารสัตว์ที่ทำการสนับสนุนกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณครอบครัว พี่ๆและน้องๆที่ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือและคอยดูแลกันเป็นอย่างดีตลอดเวลาที่ยากลำบาก

นางสาวชรีพร ดวงแก้ว

นางสาวธนัชพร หวานชะเอม

นายธีรน้อย เปลียนสกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	1
1.3 ปัจจัยที่ทาการศึกษา.....	1
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	3
2.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาวะที่เหมาะสม.....	3
2.2.1 แหล่งอาหาร.....	4
2.2.1.1 แหล่งคาร์บอน.....	4
2.2.1.2 แหล่งไนโตรเจน.....	4
2.2.1.3 แหล่งเกลือแร่.....	4
2.2.2 อุณหภูมิ.....	5
2.2.3 พีเอช (pH).....	5
2.2.4 อายุของหัวเชื้อ.....	5
2.2.5 อากาศและความชื้น.....	5
2.2.6 แสง.....	5
2.2.6.1 แสงไฟแอลอีดี.....	6
2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	6
2.3.1 กรดนิวคลีอิก (nucleic acid).....	6
2.3.2 อะดีโนซีน (adenosine).....	6

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3 คอริโดเซปิน (cordycepin).....	7
2.3.4 พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide).....	9
2.3.5 แครโทีนอยด์ (carotenoid).....	9
2.3.6 กรดไขมัน (fatty acid).....	9
2.3.7 ธาตุโลหะ (trane element).....	9
2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	12
2.5 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	15
2.5.1 การสกัดด้วยน้ำ.....	16
2.6 แหล่งอาหารจากธรรมชาติ.....	16
2.6.1 ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (riceberry).....	16
2.6.2 กากถั่วเหลือง(soybean meal).....	16
2.6.3 ไข่ไก่ (egg).....	17
2.6.4 นมผง (milk powder).....	17
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	27
3.1.1 วัสดุดิบ.....	27
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.2.1 Potato Dextose Agar (PDA) เสริม.....	27
3.2.2 Potato Dextose Broth (PDB) เสริม.....	27
3.3 อุปกรณ์.....	27
3.4 สารเคมี.....	28
3.5 วิธีการเตรียมหัวเชื้อ.....	28
3.5.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น.....	28
3.5.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ.....	28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA.....	28
3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง.....	28
3.5.3 การศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อ การเจริญเติบโตของหัวเชื้อ.....	28
3.5.3.1 การศึกษาอัตราการเจริญในระยะเอกโพแนนเซียลของเชื้อ <i>C. milistalis</i> ในอาหารเหลว.....	28
3.6 การแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	29
3.6.1 วิธีการเพาะเลี้ยง.....	29
3.6.1.1 ขวดอาหารเพาะเลี้ยง.....	29
3.6.1.2 การให้แสง.....	29
3.7 การเตรียมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณ สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟี.....	29
3.7.1 การเก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	30
3.7.2 ขั้นตอนการสกัด.....	30
3.7.3 การวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วย เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC).....	30
3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
4.1. การศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหัวเชื้อ.....	31
4.2. การแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และการสกัดเส้นใยถั่งเช่าสีทองที่มีผลต่อปริมาณของสารอะดีโนซีน.....	32
4.2.1. การแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อ ปริมาณของสารอะดีโนซีน.....	32
4.2.2 การสกัดเส้นใยถั่งเช่าสีทองที่มีผลต่อปริมาณของสารอะดีโนซีน.....	33
4.3 ผลของการแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และการสกัดเส้นใยถั่งเช่าสีทองต่อปริมาณสารคอร์ไดเซปิน.....	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	38
เอกสารอ้างอิง.....	39
ภาคผนวก.....	45
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร.....	46
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง.....	48
ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณ.....	49
ภาคผนวก ง ผลการทดลอง.....	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 แสดงสารประกอบที่มีความเกี่ยวข้องกับกรดนิวคลีอิก ใน <i>C. militaris</i>	10
ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	11
ตารางที่ 2.3 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	14
ตารางที่ 2.4 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของข้าวไรส์เบอร์รี่.....	18
ตารางที่ 2.5 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองต่อน้ำหนัก 100 กรัม.....	19
ตารางที่ 2.6 ตารางที่ 2.6 คุณค่าทางโภชนาการของไข่ไก่ต่อน้ำหนัก 100 กรัม.....	19
ตารางที่ 2.7 คุณค่าทางโภชนาการของนมผงต่อน้ำหนัก 100 กรัม.....	23
ตารางที่ 4.1 แสดงการทดสอบอภิทธิพลร่วมระหว่างของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและการสกัดของสารอะดีโนซีน.....	33
ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ไข่ไก่ นมผง กากถั่วเหลือง และชุดควบคุม(เปปโตนและยีสต์สกัด).....	34
ตารางที่ 4.3 ปริมาณอะดีโนซีนที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงด้วยวิธีใช้เครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูงและอ่างควบคุมอุณหภูมิ.....	34
ตารางที่ 4.4 การทดสอบอภิทธิพลร่วมระหว่างของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและการสกัดของสารอะดีโนซีน.....	36
ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารคอร์โดเซปินที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองในแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดและสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง 2 วิธี.....	37
ตารางที่ ค-1 แสดงค่าความชื้นและค่าพีเอชของกากถั่วเหลือง ไข่ไก่ นมผง และชุดควบคุม(เปปโตนและยีสต์สกัด) ที่ปริมาตร 60 65 และ 70 มิลลิลิตร.....	49
ตารางที่ ค-2 แสดงปริมาณไนโตรเจนของยีสต์สกัดและเปปโตน.....	50
ตารางที่ ง-1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อใช้ในการคัดเลือกหัวเชื้อในสถานะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ชั่วโมงที่ 24-168.....	55
ตารางที่ ง-2 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งในการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ชั่วโมงที่ 24-168.....	55
ตารางที่ ง-3 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการสกัดสารคอร์โดเซปินจากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไข่ไก่ นมผง กากถั่วเหลือง และชุดควบคุม(เปปโตนและยีสต์สกัด).....	56
ตารางที่ ง-4 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาอภิทธิพลร่วมของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนและวิธีการสกัดสารด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงที่มีผลต่อปริมาณสารคอร์โดเซปิน.....	57

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ ง-5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยของสารคอร์โดเซปิน ที่ได้จากการทดลองที่มีปัจจัยมี 2 ปัจจัยได้แก่ แหล่งไนโตรเจน 4 ระดับ และวิธีการสกัด 2 ระดับ.....	57
ตารางที่ ง-6 การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของสารคอร์โดเซปิน ที่ใช้ในการทดลองจากการทดลองที่มีปัจจัยมี 2 ปัจจัยได้แก่ แหล่งไนโตรเจน 4 ระดับ และวิธีการสกัด 2 ระดับ.....	58
ตารางที่ ง-7 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาอิทธิพลร่วมของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนและวิธีการ สกัดสารด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงที่มีผลต่อปริมาณสารอะดีโนซีน.....	58
ตารางที่ ง-8 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยแหล่ง ไนโตรเจน 4 แหล่ง.....	59
ตารางที่ ง-9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการสกัดสารอะดีโนซีนจากแหล่ง ไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด.....	59
ตารางที่ ง-10 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของวิธีการสกัดด้วย น้ำบริสุทธิ์สูงทั้ง 2 วิธี.....	60
ตารางที่ ง-11 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของวิธีการสกัดด้วย น้ำบริสุทธิ์สูงทั้ง 2 วิธี โดยวิธีทางสถิติ T-test.....	60

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 แสดงเห็นถึงเช่าสีทอง.....	3
รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน.....	7
รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการยับยั้งการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งของสารคอร์ไดเซปิน.....	11
รูปที่ 4.1 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเห็นถึงเช่าสีทองที่สภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที.....	31
รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีน.....	32
รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของสารคอร์ไดเซปิน.....	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารคอร์โดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญพบปริมาณมากที่บริเวณดอกเห็ดโดยสามารถเสริมสมรรถภาพทางเพศ ต้านมะเร็ง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไวรัสและแบคทีเรีย เป็นต้น เนื่องจากการมีสรรพคุณทางยามากมายทำให้มีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นจำนวนมากเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพและยา ปริมาณคอร์โดเซปินมีปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยวิตามินและสารอาหารที่มีคุณค่าจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณคอร์โดเซปิน นอกจากนี้ข้าวไรซ์เบอร์รี่ซึ่งถือเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีความสำคัญในการผลิตสารสำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทองเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของเห็ดโดยทั่วไปแล้วจะใช้เปปโตเนและยีสต์สกัดแต่หากสามารถหาแหล่งไนโตรเจนอื่นๆมาทดแทนได้ก็จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตและแหล่งไนโตรเจนบางอย่าง อาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญด้วย เช่น ไข่ไก่ นมผง และกากถั่วเหลือง ล้วนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่หาได้ง่ายและมีคุณค่าทางโภชนาการมาก

การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน โดยจะประกอบด้วยการขยายหัวเชื้อลงในอาหารแข็ง แล้วจึงนำไปทำเป็นหัวเชื้อเหลว ใส่หัวเชื้อเหลวในอาหารที่จะเพาะเลี้ยงทิ้งไว้ในที่มืด เมื่อเส้นใยเดินเต็มอาหารก็จะนำไปให้แสงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเส้นใยเห็ดและการสร้างเม็ดสี แสงเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของดอกเห็ด อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 15-25 องศาเซลเซียส อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงประกอบไปด้วย แหล่งคาร์บอน คือ ธัญพืชและข้าว เพื่อใช้สร้างพลังงาน แหล่งไนโตรเจนเช่น ตัวนอนน ดักแด้ เปปโตเน ยีสต์สกัด เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เอนไซม์และโปรตีนต่างๆ วิตามิน B1 จากข้าวและธัญพืชช่วยส่งเสริมการเจริญ ในการเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งจำเป็นต้องใช้พื้นที่และระยะเวลาจึงควรที่จะให้ดอกเห็ดมีคุณภาพที่ดี การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจึงช่วยให้ผู้ผลิตลดค่าใช้จ่ายและเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตหัวเชื้อ *Cordyceps militaris*
2. การศึกษาแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนของ *Cordyceps militaris*
3. การศึกษาวิธีการสกัดสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนด้วยน้ำ

1.3 ปัจจัยที่ทำการศึกษา

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ factorial in CRD โดยทำการศึกษา 2 ปัจจัย ดังนี้ แหล่งไนโตรเจน 4 ระดับ ได้แก่ ไข่ไก่ นมผง กากถั่วเหลือง ชุดควบคุม(เปปโตเนและยีสต์สกัด) และวิธีการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง 2 ระดับ ดังนี้ สกัดโดยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 30 นาที และสกัดด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการศึกษาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อในสภาวะอาหารเหลวและการผลิตสารสำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. การศึกษาผลต่อการเจริญและการผลิตสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน โดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเช่น ไข่ นมผง และกากถั่วเหลือง โดยใช้ในปริมาณที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนจากเปปโตนและยีสต์สกัด (ลุงหยุด, 2556) เป็นชุดควบคุม
3. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง โดยใช้วิธีการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูงอุณหภูมิตั้งที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และการสกัดด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ลดต้นทุนการผลิตโดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีอยู่ในประเทศไทย เช่น ไข่ นมผง และกากถั่วเหลือง
2. ทราบถึงวิธีการสกัดคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นราแม่ลงสามารถเจริญเติบโตในตัวแมลงที่ยังมีชีวิต อาจจะทำอาหารร่วมกันหรือก่อโรคและทำให้แมลงตายได้ โดยจะอยู่ในรูปของเซลล์ยีสต์มีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงที่อาศัย เมื่อมีอาหารสารอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนจากตัวของแมลงก็จะเจริญจากเซลล์ยีสต์กลายเป็นเส้นใยทำให้เกิดโรคในแมลง เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นราแม่ลงคลาส Ascomycetes สามารถเจริญได้ในตัวหนอน ดักแด้และผีเสื้อ เป็นต้น ลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้เลย เส้นใยมีผนังกันผนังเซลล์ประกอบด้วยสารไคติน สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศในถุง ascus ที่เรียกว่า ascospore ซึ่งถุง ascus จะอยู่ใน fruiting bodies ดอกเห็ด สีบพันธุแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนีเดีย เมื่อ ascospore จากดอกเห็ดถูกแมลงกินหรือตกลงบนตัวแมลงก็จะเจริญเป็นเส้นใยสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนแทนที่ตัวแมลงในช่วงนี้ไม่ต้องการแสงในการเจริญ เส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสีขาวเมื่อสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมได้รับแสงที่เพียงพอเส้นใยก็จะถูกกระตุ้นให้เกิดการรวมกันของเส้นใยเห็ดกระตุ้นให้เกิดเม็ดสีเส้นใยจะเริ่มมีสีส้มและเจริญออกมาจากตัวแมลง ดอกมีลักษณะสีส้มเหลืองมีลักษณะดอกเรียวยาว (ธัญญา, 2555)

เห็ดถั่งเช่าสีทอง

อนุกรมวิธาน

ชื่อ	ถั่งเช่าสีทอง
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Cordyceps militaris</i>
Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycoza
Sub-phylum	Ascomycotina
Class	Ascomycotina
Order	Hypocreales
Family	Clavicipitaceae
Genus	<i>Cordyceps</i>
Species	<i>militaris</i>



รูปที่ 2.1 แสดงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ที่มา: <http://www.greenclinic.in.th/cordycepsmilitaris.html>

2.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในสภาวะที่เหมาะสม

วิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้งในรูปของอาหารเหลวและอาหารแข็งที่มีธัญพืชเป็นองค์ประกอบโดยวิธีการอย่างง่ายโดยสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่ชื่อว่า “สารคอร์โดเซปิน” อยู่ในช่วง 2,000–8,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ (*Cordyceps militaris* CMRU 1 ถึง15) ซึ่งถือว่าประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี เนื่องจาก *Cordyceps*

militaris CMRU เป็นเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติแต่สามารถ ผลิตสารคอร์โดเซปินได้ในปริมาณสูงเทียบเท่ากับเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ของต่างประเทศ (*Codryceps militaris mutant*) ซึ่งได้รายงานไว้ว่ามีปริมาณสารคอร์โดเซปินที่ปริมาณ 8,579 มิลลิกรัมต่อลิตร (Das และคณะ, 2010) และจากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการและความปลอดภัยพบว่า เห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีความเหมาะสมต่อการเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และในทางอุตสาหกรรมจะทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักชีวภาพขนาดใหญ่

2.2.1 แหล่งอาหาร

อาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองมีมากมายหลายสูตรอาหาร โดยหลักแล้วจะประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เมล็ดธัญพืช น้ำตาล และแป้ง แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ หนอนไหม ไข่ ดักแด้ เปปโตเน ยีสต์สกัด บัฟเฟอร์ กรดซิตริก ดีเกลือ และวิตามินบี 1 (ธัญญา, 2555)

2.2.1.1 แหล่งคาร์บอน

เป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ส่งผลต่อการเจริญและเมตาบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนดังนี้ กลูโคส ฟรุกโตส กาแลกโตส มอลโทส ซูโครส เด็กโตส สตาร์ช และเซลลูโลส พบว่าเด็กโตสในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญรองลงมาคือ สตาร์ช ซูโครส และมอลโทส นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าการใช้เด็กโตสร้อยละ 4 ในอาหารเหลวจะให้ปริมาณคอร์โดเซปินสูงสุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าการใช้กลูโคสจะให้คุณภาพดอกเห็ดที่ดีที่สุดในที่นี้หมายรวมถึงน้ำหนักแห้ง ปริมาณอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินรองจากกลูโคสพบว่าเป็นซูโครสและมอลโทส (Wen และคณะ, 2014)

2.2.1.2 แหล่งไนโตรเจน

เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากกว่าซึ่งคือ ยีสต์สกัดให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุด โดยยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ในอาหารเหลวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สารคอร์โดเซปินมากที่สุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดได้มีการทำงานวิจัยพบว่า การใช้เปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งจะให้ปริมาณน้ำหนักแห้ง สารอะดีโนซีนและสารคอร์โดเซปินในปริมาณที่สูง แต่การใช้น้ำมันถั่วเหลืองจะทำให้ได้ปริมาณคอร์โดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมากที่สุด (Wen และคณะ, 2014) การใช้ยีสต์สกัดและเปปโตเนรวมกันในการเพาะเลี้ยงช่วยในการสังเคราะห์กัวนิล อะดีโนซีน และคอร์โดเซปิน โดยใช้อัตราส่วนทั้งเปปโตเนและยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันส่งผลต่อการสังเคราะห์นิวคลีโอไซด์และสารเมตาบอไลต์อื่นๆ (Gu และคณะ, 2007)

2.2.1.3 แหล่งเกลือแร่

เกลือแร่ช่วยในการเจริญและพัฒนาของเชื้อราชนิดต่างๆ ดังนั้นแล้วเกลือแร่จึงเป็นสิ่ง

ที่จำเป็นต้องใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง จากงานวิจัยการหาเกลือแร่ที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตรายของเห็ดถึงเช่าสีทองพบว่า โปแทสเซียมซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตช่วยให้มีดอกเห็ดและสารคอร์ไดเซปินในปริมาณสูง (Wen และคณะ, 2014)

2.2.2 อุณหภูมิ

เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อนั้นๆ จากการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเจริญของเชื้อเห็ดถึงเช่าสีทอง (Tuli และคณะ, 2014)

2.2.3 พีเอช (pH)

พีเอชเป็นสิ่งสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์โดยเฉพาะกับเชื้อราในกลุ่มแอสโคมายซิสและเบซิโอมายซิส โดยทั่วไปแล้วพีเอชที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดถึงเช่าจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 7 พีเอชที่ต่างกันจะส่งผลต่อการเผาผลาญสารอาหารและการเจริญของเส้นใย ดังนั้นเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในช่วงพีเอช 4-7 แล้วพบว่าพีเอชที่ให้ปริมาณคอร์ไดเซปินมากที่สุดเป็นช่วงพีเอชที่ 5.5

2.2.4 อายุของหัวเชื้อ

อายุของหัวเชื้อเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการผลิตคอร์ไดเซปินและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากการทดลองการเลี้ยงหัวเชื้อเหลวชั่วโมงที่ 24 ถึง 144 พบว่าหัวเชื้อที่ชั่วโมงที่ 72 จะให้ปริมาณคอร์ไดเซปินมากที่สุดเมื่อนำหัวเชื้อมาเหลวมาเลี้ยงในอาหารเหลว (Tuli และคณะ, 2014)

2.2.5 อากาศและความชื้น

อากาศเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศ มีงานวิจัยที่แสดงว่าออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญในการเจริญของเส้นใยและการผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อราให้มีปริมาณสูง (Shih และคณะ, 2007) ความชื้นร้อยละ 70-80 เป็นความชื้นตามธรรมชาติที่เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีหากไม่ควบคุมความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงที่เป็นอาหารแข็งจะทำให้อาหารแห้งอย่างรวดเร็วส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ

2.2.6 แสง

ในที่มืดเส้นใยของเห็ดถึงเช่าสีทองจะมีสีขาว แสงจะไปกระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดสีและทำให้เกิดการรวมกันของเส้นใยกลายเป็นดอก ช่วยในการปรับปรุงสี เพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ คอร์ไดเซปิน แคลโรทีนอยด์ และโพลีแซคคาไรด์ โดยแคลโรทีนอยด์จะทำให้ดอกเห็ดมีสีทองเข้มซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพทางการค้า นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญที่จะกำหนดความหนาแน่นเนื้อสัมผัส และสีของเส้นใยเห็ดถึงเช่าสีทอง แสงสีแดงส่งผลให้เกิดการเจริญของเส้นใยและเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนอะดีโนซิน ในขณะที่แสงสีฟ้าช่วยในการสังเคราะห์คอโคไดเซปินของเส้นใย แสงสีชมพู (1/3 สีฟ้า + 2/3 สีแดง) ช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งและช่วยให้เกิดการสะสมของแคลโรทีนอยด์และคอร์

โดเซปิน ขณะที่แสงสีแดงช่วยเพิ่มปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถึงเช้าสีทอง แสดงให้เห็นว่าการให้แสงในการเพาะเลี้ยง นอกจากจะเพิ่มร้อยละผลได้แล้วยังส่งผลต่อคุณภาพของดอกเห็ดถึงเช้าสีทองอีกด้วย

2.2.6.1 แสงไฟแอลอีดี

เป็นอุปกรณ์จำพวกไดโอดที่สามารถเปล่งแสงได้ในช่วงสเปกตรัมแคบ เปล่งแสงได้ในช่วงอุลตราไวโอเล็ตและในช่วงแสงที่มองเห็นได้ ไฟแอลอีดีสามารถปล่อยแสงสีขาว (ความยาวคลื่นหลายความยาวคลื่นผสมกัน) หรือแสงช่วงความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่งได้ขึ้นกับการผลิตทำให้สามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการในการเพาะเลี้ยงราหรือพืชได้ หลอดไฟแอลอีดียังช่วยลดการใช้พลังงานลงร้อยละ 70 และปล่อยความร้อนเพียงเล็กน้อยทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิ หลอดไฟแอลอีดีมีอายุการใช้งานถึง 50000 ชั่วโมงขึ้นไป เมื่อเทียบกับหลอดไฟธรรมดาที่ใส่เป็นปรอทมีอายุการใช้งานเพียง 200 ชั่วโมง

Jing และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของการใช้แสงไฟแอลอีดีในการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเช้าสีทองโดยใช้ช่วงความยาวคลื่นที่มองเห็นได้ดังนี้ แสงสีชมพู (450-460 นาโนเมตร) สีแดง (620-630 นาโนเมตร) สีฟ้า (450-460 นาโนเมตร) พบว่าแสงสีชมพูช่วยเพิ่มปริมาณสารแคโรทีนอยด์ คอโรโดเซปิน และอะดีโนซีนมากที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแสงแดด แสงสีฟ้าและแสงสีแดง

Dong และคณะ (2012) ทำการศึกษาผลของสีที่นิยมและความยาวคลื่นต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถึงเช้าสีทอง พบว่าแสงสีฟ้าช่วยเพิ่มปริมาณสารคอโรโดเซปินมากที่สุด แสงสีแดงช่วยเพิ่มปริมาณอะดีโนซีนและการเจริญของเส้นใยได้มากที่สุด ความยาวคลื่นของแสงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถึงเช้าสีทองที่เลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว

Yi และคณะ (2014) ทำการศึกษาผลของการใช้แสงไฟแอลอีดีสีต่างๆต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถึงเช้าสีทอง พบว่าแสงไฟแอลอีดีสีฟ้ามีความจำเป็นต่อการกระตุ้นให้เกิดดอก และแสงไฟแอลอีดีสีขาว (แสงสีแดงกับแสงสีฟ้าอัตราส่วน 2:1 และ แสงฟ้าเรดร้อยละ 10) ช่วยเพิ่มปริมาณคอโรโดเซปิน น้ำหนักสดน้ำหนักแห้ง และปริมาณตุ่มตาดอกเห็ดได้ดีที่สุด

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในเห็ดถึงเช้าสีทอง

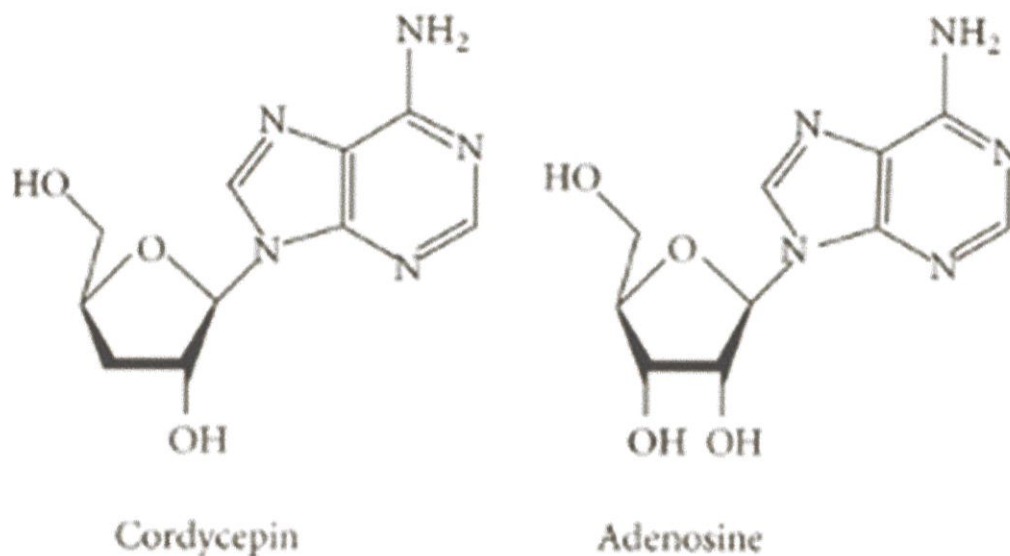
2.3.1 กรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

เห็ดถึงเช้าสีทองประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกหลายชนิดแต่ชนิดที่มีความสำคัญแสดงอยู่ในตารางที่ 2.1

2.3.2 อะดีโนซีน (adenosine)

อะดีโนซีนเป็นนิวคลีโอไซด์ที่พบได้โดยทั่วไปในเซลล์ของร่างกายมีสูตรทางเคมีดังนี้ 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purine โครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.2 อะดีโนซีนเกิดจากการจับของอะดีนินกับน้ำตาลไรโบสพันธะที่เกิดขึ้นระหว่างอะดีนินและน้ำตาลไรโบสเรียกว่าพันธะ β -N-glycosidic อะดีโนซีนช่วยในการถ่ายโอนพลังงานภายในเซลล์ในรูปของอะดีนินไตรฟอสเฟต (ATP) และอะดีนินไดฟอสเฟต (ADP) นอกจากนี้อะดีโนซีนจะฟอร์มตัวเป็นไซคลิกอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต(cAMP) ซึ่งจะ

เป็นตัวส่งสัญญาณในหลายๆวิธีเมทาบอลิซึมของร่างกาย (Mandal, 2014) ภายในตับอะดีโนซีนช่วยเพิ่มการเปลี่ยนไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ภายในสมองสภาวะปกติอะดีโนซีนช่วยในการนอนหลับลดการถูกระตุ้นทางอารมณ์ในระบบหมุนเวียนเลือดอะดีโนซีนช่วยให้กล้ามเนื้อหัวใจมีแรงมากขึ้นช่วยขยายหลอดเลือด ดังนั้นอะดีโนซีนจึงถูกใช้เป็นยาในการรักษาโรคเกี่ยวกับกล้ามเนื้อหัวใจ ช่วยให้หัวใจเต้นเป็นปกติ อะดีโนซีนมีลักษณะตรงข้ามกับอะดรีนารีนทำให้ต้านการแข็งตัวของเลือดและลิ่มเลือด (Ling และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน

ที่มา: <http://www.ergo-log.com/fit-athletes-derive-more-benefit-from-testosterone-boosters-cordyceps-sinensis-and-ganoderma-lucidum.html>

2.3.3 คอร์โดเซปิน (cordycepin)

คอร์โดเซปิน เป็นสารสำคัญของเห็ดถั่งเช่าที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายประการมีลักษณะเป็นอนุพันธ์ของอะดีโนซีนโครงสร้างโมเลกุลเหมือนกับอะดีโนซีนแต่ขาดหมู่ไฮดรอกซิล (3'-hydroxyl group) โครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.2 ซึ่งทำให้โครงสร้างโมเลกุลของคอร์โดเซปินมีความแข็งแรงมากสามารถเข้าไปรบกวนกระบวนการทางชีวเคมีของร่างกายได้ เช่น การสังเคราะห์พิวรีน การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ(DNA) และอาร์เอ็นเอ(RNA) เป็นต้น โดยสามารถแบ่งบทบาทของคอร์โดเซปิน ได้ดังนี้ (Tuli และคณะ, 2013)

1. การยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ การส่งสัญญาณของโปรตีน mTORและการสังเคราะห์พิวรีน

สารคอร์โดเซปินเป็นอนุพันธ์ของอะดีโนซีนมีโครงสร้างที่คล้ายกันมากซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสในโตรจีนัสเบสเพื่อสังเคราะห์อาร์เอ็นเอไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ทำให้คอร์โดเซปินสามารถแทนที่อะดีโนซีนได้ส่งผลให้กระบวนการถอดรหัสอาร์เอ็นเอถูกยกเลิก ในการส่งสัญญาณของโปรตีน mTOR คอร์โดเซปินจะไปหยุดกระบวนการโดยกระตุ้นให้เอนไซม์ AMP kinase ทำงานซึ่งจะทำให้กระบวนการแปลรหัสถูกยับยั้งรวมถึงการเพิ่มจำนวนและการเจริญของเซลล์นอกจากนี้คอร์โดเซปินเมื่ออยู่ภายในเซลล์จะอยู่ในรูป 5' โมโน ไดและไตรฟอสเฟตซึ่งจะไปขัดขวางเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์พิวรีน (Tuli และคณะ, 2013)

2. การเหนี่ยวนำให้เกิดอะปอโทซิส (apoptosis)

อะปอโทซิสเป็นการตายของเซลล์ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเซลล์ เช่น การบวม (blebbing) เป็นลักษณะที่เซลล์จะสูญเสียความสามารถในการยึดเกาะและเกิดการหดตัวของไซโทพลาซึม การแตกหักของดีเอ็นเอ และการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางชีวเคมีรวมถึงกระตุ้นให้เอนไซม์แคสเปส (caspases) ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์โปรตีเอสที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการตายของเซลล์ที่ทำงานทั้งภายนอกและภายในไมโทคอนเดรีย มีงานวิจัยที่แสดงว่าคอร์โดเซปินสามารถช่วยเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์โดยอาศัยการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ (He และคณะ, 2010)

3. การควบคุมวัฏจักรของเซลล์

คอร์โดเซปินจะเข้าไปส่งผลกับวัฏจักรของเซลล์ที่จุดเช็คพอยท์ (check point) ซึ่งในวัฏจักรของเซลล์จะถูกควบคุมด้วยเอนไซม์ cyclin-dependent kinases (CDKs) และ cyclin และ cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) พบว่าในเซลล์มะเร็ง (OEC-MI) คอร์โดเซปินสามารถลดเซลล์ในระยะ G1 และทำให้เซลล์ในระยะ G2M และ sub-G1 เพิ่มขึ้น (Tuli และคณะ, 2013) มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าคอร์โดเซปินจะไปจับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (VSMC) ซึ่งอยู่ในระยะ G1 และจะไปลดเอนไซม์ cyclin/CDK เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ซึ่งเป็นคุณสมบัติในยาต้านมะเร็ง (Jung และคณะ, 2012)

4. ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังอวัยวะเป้าหมายได้โดยอาศัย EMC (extracellular matrix) แพร่ผ่านไปยังกระแสเลือดโดยจะมีเอนไซม์เมทัลโลโปรตีเอส (metalloproteinase; MMPs) เป็นเอนไซม์ที่ร่างกายปล่อยมาเพื่อย่อยสลาย EMC ซึ่งประกอบไปด้วยคอลลาเจนชนิดที่ 4 (type IV collagen) ลามินิน เปปติโดไกลแคน โดยเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 เป็นสองเอนไซม์ที่ย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 4 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่เยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไปมี ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์ MMPs จึงทำให้เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปยังเส้นเลือดและเซลล์ปกติของร่างกายได้ (Tuli และคณะ, 2013) สารคอร์โดเซปินจะไปกระตุ้นการแสดงออกของ TIMP1 และ TIMP2 ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ MMP-2 และ MMP-9 ดังรูปที่ 2.3 (Nakamura และคณะ, 2015)

5. ยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดในเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดซึ่งช่วยให้เซลล์มะเร็งสามารถไหลเวียนในกระแสเลือดได้ง่ายขึ้น ระหว่างการแพร่กระจายในกระแสเลือดเกล็ดเลือดจะป้องกันการทำลายจากเซลล์เอ็นเค (natural killer cell; NK) และเซลล์ไซโตทอกซิกลิมโฟไซด์ (cytotoxic

lymphocytes) (Tuli และคณะ, 2013) โดยเซลล์มะเร็งจะปล่อย ADP ออกมาเพื่อกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือดและจะเข้าไปจับกับกลุ่มของเกล็ดเลือดนั้นและแพร่กระจายไปตามหลอดเลือดเข้าสู่อวัยวะเป้าหมาย สารคอร์โดเซปินจะไปยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือดทำให้เซลล์มะเร็งไม่อาจจับกับกลุ่มเกล็ดเลือดได้ ดังรูปที่ 2.3 (Nakamura และคณะ, 2015) มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของเห็ดถั่งเช่าสีทองดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.3.4 พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide)

ซึ่งเป็นสารเบต้า-กลูแคนในเห็ดมีสรรพคุณในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ต่อต้านอนุมูลอิสระให้ร่างกายเป็นอย่างดี เป็นผลทำให้ร่างกายสมดุลเป็นปกติ และยังทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายได้ ช่วยทำให้ผู้ป่วยมะเร็งมีชีวิตยืนยาวต่อไปได้อีก นอกจากนี้สารเบต้า-กลูแคนในเห็ดยังไปส่งเสริมให้ร่างกายกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนให้แก่เซลล์ผิวหนัง ทำให้บริเวณผิวหนังมีความยืดหยุ่น มีการสร้างเซลล์ใหม่เกิดขึ้น มีความเต่งตึงและลดการเหี่ยวย่นของผิวหนังได้ แต่ในเห็ด แต่ละชนิดมีสารเบต้า-กลูแคนที่แตกต่างกันจึงมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันและต่อต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันไปด้วย (พรพจน์, 2556)

2.3.5 แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) และเป็นสารสีของเห็ดที่ทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสีเหลืองส้ม

2.3.6 กรดไขมัน (fatty acid)

Seth และคณะ (2014) พบว่าเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ *Cordyceps* ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่าประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวถึงร้อยละ 57.84 พบกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) สูงที่สุดถึงร้อยละ 38.44 และยังประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid) ร้อยละ 17.9 พบกรดไขมันอิ่มตัวถึงร้อยละ 42.16 พบว่ามีกรดปาล์มมิติก (palmitic acid) และกรดออกทเดคาโนอิก (octadecanoic acid) สูงที่สุดถึงร้อยละ 21.86 และ 15.78 ตามลำดับ กรดไขมันไม่อิ่มตัวช่วยลดระดับปริมาณไขมันในเส้นเลือด และช่วยป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด

2.3.7 ธาตุโลหะ (trace element)

Seth และคณะ (2014) พบว่าธาตุโลหะที่พบในเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ *Cordyceps* จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเห็ดและธาตุโลหะ โดยมากจะประกอบด้วยธาตุสังกะสี และแมกนีเซียมในปริมาณสูงซึ่งมีบทบาทสำคัญในเรื่องของโรคไต และช่วยฟื้นฟูไต

Dong และคณะ (2013) พบว่าธาตุซีลีเนียม (selenium) เป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ คือ มีบทบาทสำคัญโดยทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของแอนติออกซิแดนซ์เอนไซม์ (antioxidant enzyme) เรียกว่า ซีลีโนเอนไซม์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ขึ้นอยู่กับซีลีเนียม (selenium-dependent enzyme) ซึ่งอยู่ในรูปกรดซีลีโนเอมิโน เช่น ซีลีโนซิสเทอีน (selenocysteine) และซีลีโนเมไทโอนีน (selenomethionine) ซึ่งเป็นซีลีโนโปรตีน (selenoprotein) ได้แก่ เอนไซม์กลูตาไรโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidases) และเอนไซม์ไทโอรีดอกซินรีดักเทส (thioredoxin reductase) เอนไซม์ดีไอโอดิเนส (deiodinase) และไอโอดิไทโรนีน (iodothyronine) โดยซีลีเนียมจะอยู่ที่ตำแหน่งกิจกรรม (active site) ของเอนไซม์เหล่านี้ ทั้งยับยั้งเนื้องอก กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ชัดขวางเชื้อเอชไอวี (HIV) เป็นต้น และพบว่าใน *Cordyceps militaris* มีองค์ประกอบของซีลีเนียมอยู่จำนวนมาก

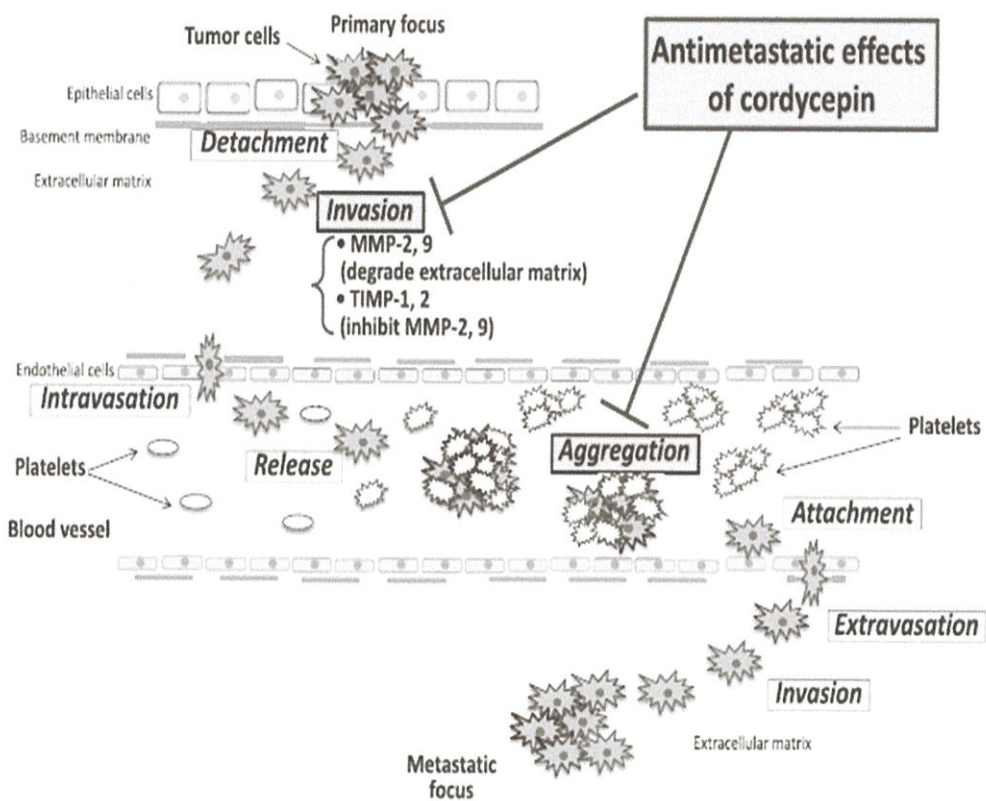
ตารางที่ 2.1 แสดงสารประกอบที่มีความเกี่ยวข้องกับกรดนิวคลีอิก ใน *C. militaris*

ปริมาณสารที่พบ (กรัม/ลิตร)	สารสกัดจากเส้นใย	สารสกัดจากดอกเห็ด
<i>C. militaris</i> NBRC 9787		
ปริมาณเส้นใย	3.29×10^4	
Adenine	2.9	2.8
Guanine	18.5	175.2
Uracil	37.1	105.0
Adenosine	91.1	52.6
Guanosine	78.7	47.1
Uridine	106.8	81.1
Cordycepin	56.2	2.5×10^3
<i>C. militaris</i> G81-3		
ปริมาณเส้นใย	3.87×10^4	
Adenine	1.6	5.1
Guanine	23.2	271.7
Uracil	29.2	185.2
Adenosine	45.4	132
Guanosine	41.3	97.8
Uridine	45.4	122.6
Cordycepin	129.7	4.5×10^3

ที่มา: Das และคณะ, 2010

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ชนิดของมะเร็ง	ชนิดของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ	การสกัด	งานวิจัยที่ตีพิมพ์
มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia)	HL-60	น้ำร้อน	Chou และคณะ, 2014
มะเร็งปอด (Lung cancer)	A54	น้ำ	Park และคณะ, 2009
มะเร็งตับ (Liver cancer)	Hep G2	เมทานอล	Rao และคณะ, 2010
	Huh 7	น้ำร้อน	Chou และคณะ, 2014
มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Colon cancer)	Colon 205	เมทานอล	Rao และคณะ, 2010
	HCT 116	น้ำร้อน	Chou และคณะ, 2014



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการยับยั้งการแพร่กระจายเซลล์มะเร็งของสารคอร์ไดเซปิน

ที่มา: Nakamura และคณะ, 2015

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆดังนี้ การเสริมสมรรถภาพทางเพศ กลไกการเพิ่มสมรรถภาพเพศชายของเห็ดถั่งเช่า สามารถอธิบายได้เป็น 3 ขั้นตอน

1. สารคอร์โดเซปิน ซึ่งเป็นสารสำคัญในเห็ดถั่งเช่าที่สามารถออกฤทธิ์ได้เท่าฮอร์โมนเพศชายหรือเทสโทสเตอโรนทำให้สารคอร์โดเซปินมีผลโดยตรงในการควบคุมสมรรถภาพทางเพศชายทั้งระบบให้ทำงานได้อย่างเต็มที่ จึงเสริมสมรรถภาพทางเพศให้กับผู้ที่มีปัญหาหนักเขาไม่ขึ้นได้ในระดับฮอร์โมน โดยที่ตัวสารคอร์โดเซปินเองไม่ได้เป็นฮอร์โมนจึงไม่รบกวนสมดุลฮอร์โมนภายในร่างกายสามารถใช้ได้อย่างปลอดภัย ให้ผลเพิ่มเสริมสมรรถภาพทางเพศ ได้ครบวงจรตั้งแต่เสริมอารมณ์ทางเพศ เพิ่มการตอบสนอง สั่งการให้องคชาติเกิดการแข็งตัวได้สมบูรณ์และรวดเร็วฉับไว มีผลต่อขนาดขององคชาติ และลักษณะอื่นๆที่แสดงออกถึงความเป็นชาย ที่สำคัญจะยังเห็นผลชัดเจนมากในผู้ที่อาการหนักเขาไม่ขึ้นที่ค่อนข้างอายุมากซึ่งมีปริมาณเทสโทสเตอโรนต่ำลง

2. หลังได้รับการเพิ่มสมรรถภาพจากสารคอร์โดเซปินในระบบฮอร์โมนที่ทำให้ ร่างกายเพศชายตอบสนองอารมณ์ทางเพศอย่างรวดเร็วฉับไวแล้ว ในเห็ดถั่งเช่ายังมีสารที่ชื่อว่า สารไนตริกออกไซด์ ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งในกระบวนการการแข็งตัวขององคชาติ ซึ่งจะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดเพิ่มปริมาณเลือดเข้าสู่คอร์ปัสคาเวอโรนัมในองคชาติได้อย่างดีเยี่ยม ซึ่งเป็นกลไกหลักที่สำคัญที่สุดของการแข็งตัวและการรักษานกเขาไม่ขึ้น เพิ่มสมรรถภาพ เสริมสมรรถภาพเพศชายได้อย่างดีเยี่ยม ผลที่ได้คือการแข็งตัวสมบูรณ์เต็มที่ และมีระยะเวลาในการแข็งตัวนานพอเสร็จกิจกรรม

3. ผลของเห็ดถั่งเช่าในการเพิ่มเสริมและดูแลสุขภาพร่างกายโดยรวม ซึ่งจัดเป็นการเพิ่มสมรรถภาพ เสริมสมรรถภาพแก่นกเขาไม่ขึ้นทางอ้อมที่สำคัญไม่แพ้กลไกอื่นๆ สุขภาพร่างกายที่แข็งแรง ส่งผลอย่างมากต่อสมรรถภาพทางเพศที่ดียิ่งขึ้น และมีสมรรถภาพที่ดีอย่างยั่งยืน เห็ดถั่งเช่ามีผลต่อการเพิ่มเสริมสมรรถภาพทางเพศอย่างมาก เช่น ป้องกันการแข็งตัวของเลือดและผนังหลอดเลือด ผลในการเพิ่มสารอะดีนาลีนให้กับร่างกายซึ่งช่วยเพิ่มพลังงาน ลดอาการอ่อนเพลีย ช่วยให้หลับสนิท ซึ่งการนอนหลับสนิทจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชายทำงานเต็มที่ ชะลอความเสื่อมส่วนต่างๆของร่างกายรวมไปถึงส่วนที่เกี่ยวข้องกับสมรรถภาพทางเพศด้วย อื่นๆเช่นรักษาโรคภูมิแพ้ และหอบหืด เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อให้คนใช้รับประทานเห็ดถั่งเช่าทีเบตต่อเนื่องกันจะสามารถฟื้นฟูสมรรถภาพทางเพศได้ (Wan และคณะ, 1998) รวมถึงเพิ่มปริมาณเชื้ออสุจิให้มากขึ้น และสามารถป้องกันการลดปริมาณของเชื้ออสุจิในคนไข้ได้ (Guo, 1986)

Lin และคณะ (2007) ศึกษาผลต่อการผลิตอสุจิของหนูพันธุ์ดูว์รอคและแลนด์เรซ เมื่อได้รับเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ามีการผลิตสเปิร์มการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงปลายเดือนแรก และในช่วงเดือนที่สอง ปริมาณร้อยละของเซลล์สเปิร์มที่สามารถเคลื่อนไหวและสัณฐานวิทยาของสเปิร์มมีคุณภาพมากขึ้น (Chang และคณะ 2008) ศึกษาผลต่อการผลิตอสุจิของหนูทดลองพันธุ์ Sprague Dawley เมื่อได้รับเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าความเข้มข้นของคอร์โดเซปินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยระดับของคอร์โดเซปินที่เพิ่มขึ้นก็ขึ้นอยู่กับปริมาณเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้รับ กลุ่มที่ได้รับปริมาณสูงกว่า (ร้อยละ5) ก็มีระดับของคอร์โดเซปินสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ได้รับปริมาณเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองน้อย

กว่า (ร้อยละ 1) หลังจากหยุดให้เส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง มีการเพิ่มขึ้นของฮอโมนเทสโทสเทอโรนและฮอโมนเอสทราดิออล-17 (E2) หรือฮอโมนเพศหญิงที่สร้างจากฟอลลิเคิลในรังไข่ และที่สำคัญปริมาณร้อยละของเซลล์สเปิร์มที่สามารถเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของฮอโมนเทสโทสเทอโรน คุณสมบัติด้านการอักเสบ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และชะลอความชรา ในแวดวงวิชาการได้ตีพิมพ์บทความ บทความวิชาการจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง ต่างยอมรับว่ากิจกรรมของเอนไซม์มอโนออกซิเดส (Monoamine oxidase activity; MAO) ได้เพิ่มขึ้นตามอายุที่มากขึ้นและสารเคมีชีวภาพต่างๆ ที่นับวันเพิ่มมากขึ้นนั้นทำให้ร่างกายได้รับผลกระทบอย่างหนักเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ร่างกายแก่ชราเร็วขึ้น อนุมูลอิสระเป็นสารที่ทำลายสารพันธุกรรมของร่างกายเป็นตัวการที่ทำให้คนเราชราเร็วและป่วยเป็นโรคชนิดต่าง ๆ การทดสอบจำนวนมากทั้งภายในและภายนอกร่างกายได้พิสูจน์แล้วว่า “เห็ดถั่งเช่า” มีส่วนผสมเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันจากธรรมชาติในปัจจุบันสามารถลดอาการบาดเจ็บของอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ จากผลของอนุมูลอิสระ และมีบทบาทที่เด่นชัดในการยับยั้งเอนไซม์มอโนออกซิเดส จากนั้นจึงไปชะลอการเสื่อมโทรมและความชราภาพของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายมีประสิทธิภาพสูงในการชะลอความแก่และช่วยยืดอายุขัยให้ยืนยาว

Cheng และคณะ (1995) และ Hao และคณะ (2008) ได้ทำการทดสอบกับผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะ 4 โดยให้รับประทานวันละ 2-3 กรัม ควบคู่กับการใช้เคมีบำบัด พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นถึงร้อยละ 95 ผู้ป่วยสามารถที่จะทนต่อสารเคมีบำบัดได้ดีกว่าผู้ที่ไม่ได้รับประทานเห็ดถั่งเช่า และยังพบว่าปริมาณไขกระดูกสูงกว่าผู้ที่ไม่ได้รับประทาน

Won และคณะ (2005) ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและยับยั้งอนุมูลอิสระ ของเส้นใยและดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 พบว่าตัวอย่างทั้งเส้นใยและดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองล้วนมีกระตุ้นให้เกิดการด้านการอักเสบและอาการปวดในหนู และพบว่าในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีด้านการอักเสบดีกว่าเส้นใย นอกจากนี้เส้นใยและดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเกี่ยวเนื่องกับการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide ;NO) ซึ่งใช้เอนไซม์ไนตริกออกไซด์ ซินเทส (nitric oxide synthase; iNOS) โดยเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีอาการอักเสบ และทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส จากการต้านอนุมูลอิสระ จึงอาจสนับสนุนฤทธิ์ด้านการอักเสบและอาการปวดในหนู ฤทธิ์ด้านมะเร็ง มะเร็งเม็ดเลือดขาว และเซลล์เนื้องอก และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

Jordan และคณะ (2010) ได้ศึกษาสตรีที่เป็นมะเร็งเต้านมระยะสุดท้าย โดยให้รับประทานเห็ดถั่งเช่าควบคู่ไปกับการผ่าตัดเอาเนื้องอกออก ผลปรากฏว่าสามารถลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ โดยการไปกระตุ้นการสร้างมาโครฟาจ (macrophage) ซึ่งจะเป็นตัวที่จะคอยทำลายเซลล์มะเร็ง

Kubo และคณะ (2010) ทำการทดสอบการยับยั้งเซลล์เนื้องอกในตับไม่ให้ขยายขนาดโดยการใช้น้ำสกัดจากเห็ดถั่งเช่าที่เบต ฉีดเข้าไปในหนูทดลองที่ได้รับเซลล์เนื้องอกตับอยู่แล้ว ผลปรากฏว่า

เซลล์นี้ออกไม่สามารถขยายตัวเข้าทำลายเนื้อเยื่อตับได้และทำให้หนูมีอายุยืนยาวกว่ากลุ่มควบคุมมาก

เห็ดถั่งเช่ามีฤทธิ์ด้านภูมิคุ้มกันโดยป้องกันการจับตัวของสารก่อภูมิแพ้กับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ และหอบหืดเกือบทุกรายมีกลไกนี้ไวกว่าปกติ การลดกลไกนี้ลงจะทำให้ร่างกายตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้ลดลง

เห็ดถั่งเช่ายังมีฤทธิ์ในการปรับสภาพระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานมากกว่าปกติของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้และ หอบหืด ให้กลับสู่ภาวะปกติใน 3 ส่วนหลักคือ Allergen-reactive helper T cells การจับตัวของสารก่อภูมิแพ้กับระบบภูมิคุ้มกัน และการสร้าง IgE ทำให้ร่างกายของผู้ป่วยโรคภูมิแพ้ไม่แสดงอาการอีกต่อไปแม้ได้รับสารก่อภูมิแพ้ เมื่อรักษาด้วยเห็ดถั่งเช่าอย่างต่อเนื่องควบคู่กับการดูแลสุขภาพและออกกำลังกายอย่างพอเหมาะ อาจมีผลให้ระบบภูมิคุ้มกันอยู่ตัว และหายขาดจากโรคภูมิแพ้ โรคภูมิแพ้ทางอากาศและยังช่วยป้องกันการอักเสบและหดตัวของหลอดลม ป้องกันอาการหอบหืดกำเริบได้อย่างสมบูรณ์นอกจากนี้เห็ดถั่งเช่ายังมีคุณค่าเป็นยาปฏิชีวนะธรรมชาติที่ต่อต้านเชื้อ เช่น *Pneumococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. ได้เป็นอย่างดี เชื้อเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ที่จะทำให้อาการหอบหืด และภูมิแพ้แย่ลงจากการอักเสบและเสมหะที่เหนียวข้น เห็ดถั่งเช่าจึงช่วยป้องกันโรคติดเชื้อเหล่านี้ได้ เช่น ไซนัสอักเสบ หลอดลมอักเสบ ทอมซิลอักเสบ เป็นต้น

ฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ

Kim และคณะ (2002) ศึกษาการทำลายฤทธิ์การทำลายระยะลาร์วาของ *Plutella xylostella* โดยเห็ดถั่งเช่าสีทองจากหนอน โดยสารสกัดจากดอกเห็ดมีฤทธิ์ทำลายมากกว่าจากสารสกัดจากหนอนที่ใช้เลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยเกิดจากฤทธิ์ของคอร์โดเซปิน นอกจากนี้เห็ดถั่งเช่าสีทองยังมีฤทธิ์ต่างๆอีกมากมายดังที่แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ฤทธิ์ทางชีวภาพ	
Pro-sexaul	เสริมสมรรถภาพทางเพศ
Anti-inflammatory	ต้านการอักเสบ
Anti-oxidant/anti-aging	ยับยั้งอนุมูลอิสระ/ชะลอความชรา
Anti-tumour/anti-cancer	ต้านมะเร็งและเซลล์เนื้องอก
Anti-leukemic	ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว
Anti-proliferative	ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์
Anti-metastatic	ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

Immunomodulatory	ระบบภูมิคุ้มกัน
Anti-microbial	มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลชีพ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรียริกเกตเซีย เชื้อรา เชื้อปรสิต และโปรโตซัว
Insecticidal	มีฤทธิ์ฆ่าแมลง
Larvicidal	มีฤทธิ์ฆ่าหนอน
Anti-fibrotic	ด้านการเกิดเส้นใยพังผืด (Anti-fibrotic)
Steroidogenic	การสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์
Hypoglycaemic	ลดอาการน้ำตาลในเลือดสูง
Hypolipidaemic	ลดไขมันในเส้นเลือด
Anti-angiogenic	ขัดขวางการสร้างหลอดเลือดฝอย
Anti-diabetic	ป้องกัน หรือบรรเทาอาการโรคเบาหวาน
Anti-HIV	ต้านเชื้อเอดส์
Anti-malaria	ต้านโรคมาลาเรีย หรือโรคไข้จับสั่น
Anti-fatigue	ลดอาการเหนื่อยล้า
Neuroprotective	ป้องกันเซลล์ประสาท
Liver-protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ
Reno- protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของไต
Pneumo- protective	ป้องกันการเสื่อมสภาพของปอด

ที่มา: ัญญา, 2555

2.5 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สารสำคัญต่างๆภายในเชื้อราสกุล *Cordyceps* จำเป็นต้องใช้การสกัดเพื่อให้ได้สารออกมา การสกัดนี้จำเป็นต้องใช้สารละลายที่มีขั้วและสะดวกในการใช้งาน เช่น เอทิลอะซิเตท เมทานอล และ น้ำ

2.5.1 การสกัดด้วยน้ำ

น้ำเป็นสารละลายที่มีขี้ที่ถูกใช้ในการสกัดมาเป็นเวลานาน เนื่องจากไม่มีพิษและหาได้ง่าย มีการทดลองสกัดโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ โดยนำผงเห็ดถึงเข้าผสมกับน้ำที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าให้ฤทธิ์ลดคลอเลสเทอรอลในหนู เมื่อนำผงดอกเห็ดถึงเข้ามาเติมน้ำในสัดส่วน 1:20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำเข้าเครื่อง autoclave เป็นเวลา 20 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่ามีฤทธิ์ช่วยรักษาโรคไตได้ จะเห็นว่าอุณหภูมิที่ใช้ต่างกันส่งผลต่อสารที่ได้จากการสกัด ความร้อนจะไปทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้สารออกมาจากเซลล์แต่สารบางตัวจะเสียดสภาพเมื่อถูกความร้อนสูง

2.6 แหล่งอาหารจากธรรมชาติ

2.6.1 ข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ลักษณะเป็นข้าวเจ้า สีม่วงเข้ม รูปร่างเมล็ดเรียวยาว ข้าวกล้องมีความนุ่มนวลมาก ปลูกได้ตลอดทั้งปี ให้ผลผลิตต่อไร่ปานกลาง ต้านทานต่อโรคไหม้ แต่ไม่ต้านทานโรคหาลาว จึงควรเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ทุกรอบการปลูก อีกข้อจำกัดคือเป็นข้าวที่ต้องการเอาใจใส่เป็นพิเศษ โดยปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ และต้องมีสภาพอากาศเย็น เพื่อสร้างสีเมล็ดลักษณะประจำพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ความสูง 105-110 เซนติเมตร อายุเก็บเกี่ยว 130 วัน ผลผลิต 300-500 กิโลกรัมต่อไร่ เปอร์เซ็นต์ข้าวกล้อง (brown rice) 76% ต้นข้าวหรือข้าวเต็มเมล็ด (head rice) 50% ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก 11 มิลลิเมตร ข้าวกล้อง 7.5 มิลลิเมตร ข้าวขัด 7.0 มิลลิเมตร ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว โดยความร่วมมือจากคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พันธุ์ชาวนี้ได้จดทะเบียนเป็นพันธุ์พืชใหม่แล้ว ห้ามนำไปขยายพันธุ์เชิงการค้าต่อ โดยไม่ได้รับอนุญาตจากวช. และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการ คือมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอี แทนนิน สังกะสี และโฟเลตสูง มีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง นอกจากนี้ รำข้าวและน้ำมันรำข้าว ทั้งยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งจากคุณสมบัติข้อนี้ นอกจากจะใช้รับประทานเพื่อเสริมสร้างสุขภาพที่ดี ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง ทางทางการแพทย์ยังนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารโภชนบำบัดอีกด้วย สารอาหารสำคัญที่อยู่ในข้าวกล้องไรซ์เบอร์รี่แสดงดังตารางที่ 2.4 (นิรนาม, 2556)

2.6.2 กากถั่วเหลือง (soybean meal)

เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันพืชจะมีปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองขึ้นกับวิธีการสกัด น้ำมัน และขนาดของเมล็ดถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองมี 2 ชนิดได้แก่ กากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมและกากถั่วเหลืองที่ไม่มีเปลือกผสมอยู่โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 47.6 และ 51.5 ตามลำดับ

เพราะฉะนั้นจึงนิยมนำกากถั่วเหลืองมาทำเป็นอาหารให้สัตว์เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ คุณค่าทางอาหารของกากถั่วเหลืองแสดงไว้ในตารางที่ 2.5 กากถั่วเหลืองจัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสู่ทอง

2.6.3 ไข่ไก่ (egg)

ไข่ไก่อุดมไปด้วยวิตามินและเกลือแร่ที่จำเป็นต่อสุขภาพและรักษาสสมดุลของร่างกาย คุณค่าทางโภชนาการของไข่ไก่แสดงดังตารางที่ 2.6 ในไข่ไก่เราสามารถพบ วิตามินเอ ช่วยในการมองเห็นและระบบภูมิคุ้มกัน วิตามินบี2 เซลล์เม็ดเลือดแดง การมองเห็นและระบบประสาท วิตามินบี12 วิตามินบี5 วิตามินดี วิตามินอี ไบโอดีนช่วยในการเผาผลาญพลังงาน ผิวหนัง เส้นผม และระบบภูมิคุ้มกัน โคลีน (choline) ช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ไอโอดีน ธาตุเหล็ก ฟอสฟอรัส ซีลีเนียมช่วยในการปกป้องเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันรักษาระบบภูมิคุ้มกันและต่อมไทรอยด์ ในไข่ไก่อยู่มากไปด้วยโปรตีนกว่าร้อยละ 12.6 นอกจากนี้ยังมีกรดไขมันสายยาวโอเมก้าสาม (omega-3) ช่วยระบบประสาทและการมองเห็น แต่ไข่ไก่ก็อุดมไปด้วยคอเลสเตอรอลในไข่ไก่ น้ำหนัก 44 กรัม อุดมไปด้วยคอเลสเตอรอล 164 มิลลิกรัม ซึ่งคอเลสเตอรอลจะเพิ่มโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจ (McIntosh, 2015)

2.6.4 นมผง (milk powder)

นมผงเป็นแหล่งของวิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค คุณค่าทางโภชนาการของนมผงแสดงดังตารางที่ 2.7 นมผงเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีประโยชน์ ได้แก่ เคซีน เวย์โปรตีนและกรดอะมิโน เช่น ไอโซลิวซีน ลิวซีน โลซีน เมไทโอนีน ฮิสทรีดิน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีนและทริปโทเฟนซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นต่อร่างกายทั้งหมดส่งผลให้มีสุขภาพดี นมผงยังประกอบด้วยแลคโตสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์และกาแลคโตส แลคโตสมีประโยชน์มากมายต่อร่างกายเช่น เป็นแหล่งอาหารให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย แลคโตสจะไม่ไปเพิ่มจำนวนกลูโคสในกระแสเลือดย่อยสลายได้ช้ากว่ากลูโคสและฟรุกโตส ดังนั้นจึงช่วยลดน้ำหนักได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้แลคโตสยังช่วยในการดูดซับแคลเซียมในร่างกาย (Taylor, 2015)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Park และคณะ (2002) ศึกษาผลของน้ำมันพืชและกรดไขมันต่อการผลิต exo-biopolymer ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากงานวิจัยพบว่า กรดไขมันหลายชนิดเช่น กรดปาล์มติก และกรดไลโนเลอิกเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิต exo-biopolymer และการเจริญของเส้นใย

Mao และ Zhong (2006) ศึกษาผลของแอมโมเนียมต่อการผลิตคอร์ไคเซปินในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยอาหารเหลว โดย สารประกอบไนโตรเจนที่แตกต่างกันมีความแตกต่างกัน มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง เช่นไทโรซีน โลซีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่า ประเภทของสารประกอบไนโตรเจนมีผลต่อการสังเคราะห์สารคอร์ไคเซปิน โดยแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ปริมาณสารคอร์ไคเซปินสูงที่สุด ซิสเทอีน ซีรีน อะลานีนและไกลซีนก็มีผลต่อการผลิตสารคอร์ไคเซปิน

ตารางที่ 2.4 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของข้าวไรซ์เบอร์รี่

สารอาหาร	ปริมาณ	ประโยชน์ต่อร่างกาย
โอเมก้า 3	25.51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	เป็นกรดไขมันที่มีส่วนสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของสมอง ตับและระบบประสาท ลดระดับโคเลสเตอรอล
ธาตุสังกะสี	31.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	ช่วยสังเคราะห์โปรตีน สร้างคอลลาเจน รักษาผิวหนังกันผื่นรังกระตุ้นรากผม
ธาตุเหล็ก	13-18 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	ช่วยเสริมสร้างพลังงานในร่างกาย เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง และเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ออกซิเจนในร่างกายและสมอง
วิตามินอี	678 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม	ช่วยชะลอความแก่ บำรุงผิวพรรณลดโอกาสเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดสมองและหัวใจ ทำให้ปอดทำงานดีขึ้น
วิตามินบี 1	0.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	มีความจำเป็นต่อการทำงานของสมอง ระบบประสาท ระบบย่อยอาหาร รวมทั้งป้องกันเหน็บชา
เบต้าแคโรทีน	63 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม	ช่วยชะลอความแก่ ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง ช่วยบำรุงสายตา
ลูทีน	84 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม	ป้องกันจอประสาทตาเสื่อม บำรุงการไหลเวียนของเลือดในเส้นเลือดฝอยที่หล่อเลี้ยงตา
โพลีฟีนอล	113.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	ทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระป้องกันโรคมะเร็ง
แทนนิน	89.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	แก้ท้องร่วง แก้บิด สมานแผล
แกมมา โอโรซานอล	462 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม	ลดระดับคอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในหลอดเลือด ทำให้เลือดหมุนเวียนไปเลี้ยงอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ อย่างเป็นปกติ ลดอัตราเสี่ยงของโรคหัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง สมองเสื่อม
เส้นใยอาหาร (Fiber)	มีอยู่ปริมาณมากในข้าวไรซ์เบอร์รี่	ช่วยในการขับถ่าย
สารต้านอนุมูลอิสระ	เป็นสารที่พบมากในข้าวไรซ์เบอร์รี่	ช่วยลดโอกาสการเกิดโรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด และโรคมะเร็งได้

ที่มา: กองบรรณาธิการการเกษตร, 2557, หน้า 40-47

ตารางที่ 2.5 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของกากถั่วเหลืองต่อน้ำหนัก 100 กรัม

ชนิดวัตถุดิบ	องค์ประกอบทางเคมี (กรัม)						
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต	แคลเซียม	ฟอสฟอรัส	ความชื้น
กากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสม	31.0	3.2	7.6	35	0.38	0.66	9.8
กากถั่วเหลืองที่ไม่มีเปลือกผสม	51.5	1.2	7.3	35.1	0.36	0.70	9.87

ที่มา : กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์

ตารางที่ 2.6 คุณค่าทางโภชนาการของไข่ไก่ต่อน้ำหนัก 100 กรัม

สารอาหาร	ปริมาณสารต่อหนึ่งหน่วย (100 กรัม)
การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร	
น้ำ	74.62 กรัม
พลังงาน	155 กิโลแคลอรี / 649 กิโลจูล
โปรตีน	12.58 กรัม
ไขมันทั้งหมด	10.61 กรัม
เถ้า	1.08 กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	1.12 กรัม
เส้นใย	0 กรัม
น้ำตาลทั้งหมด	1.12 กรัม
แร่ธาตุแต่ละชนิด	
แคลเซียม	50 มิลลิกรัม
เหล็ก	1.19 มิลลิกรัม
แมกนีเซียม	10 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	172 มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	126 มิลลิกรัม
โซเดียม	124 มิลลิกรัม
สังกะสี	1.05 มิลลิกรัม
ทองแดง	0.013 มิลลิกรัม
แมงกานีส	0.026 มิลลิกรัม
ซีลีเนียม	30.8 ไมโครกรัม
ฟลูออไรด์	4.8 ไมโครกรัม
วิตามินแต่ละชนิด	
วิตามินซี	0 มิลลิกรัม

วิตามินบี 1 (ไทอะมีน)	0.066 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน)	0.513 มิลลิกรัม
วิตามินบี 3 (ไนอะซิน)	0.064 มิลลิกรัม
วิตามินบี 5 (กรดแพนโทเทนิก)	1.398 มิลลิกรัม
วิตามินบี 6	0.121 มิลลิกรัม
ปริมาณโฟเลตรวม	44 ไมโครกรัม
กรดโฟลิก	0 ไมโครกรัม
โฟเลต	44 ไมโครกรัม
ปริมาณโคลีนรวม	293.8 มิลลิกรัม
เบทาอิน	0.6 มิลลิกรัม
วิตามินบี 12	1.11 ไมโครกรัม
วิตามินเอ	149 ไมโครกรัม RAE หรือ 520 IU
เรตินอล	148 ไมโครกรัม
เบต้าแคโรทีน	11 ไมโครกรัม
แอลฟาแคโรทีน	0 ไมโครกรัม
เบต้าคริปโตแซนทีน	10 ไมโครกรัม
ไลโคปีน	0 ไมโครกรัม
ลูทีนและซีแซนทีน	353 ไมโครกรัม
วิตามินอี (อัลฟาโทโคฟีรอล)	1.03 มิลลิกรัม
วิตามินดี (ดี 2 และ 3)	2.2 ไมโครกรัม
วิตามินดี3	2.2 ไมโครกรัม
วิตามินดี	87 IU
วิตามินเค1 (ฟิลโลควิโนน)	0.3 ไมโครกรัม
ไขมัน	
กรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด	3.267 กรัม
4:00	0 กรัม
6:00	0 กรัม
8:00	0.003 กรัม
10:00	0.003 กรัม
12:00	0.003 กรัม
14:00	0.035 กรัม
16:00	2.349 กรัม
18:00	0.828 กรัม
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด	4.077 กรัม
16:1	0.31 กรัม
18:1	3.725 กรัม
20:01	0.03 กรัม

22:1	0.003 กรัม
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด	1.414 กรัม
18:2	1.188 กรัม
18:3	0.035 กรัม
18:04	0 กรัม
20:4	0.149 กรัม
20:5 n-3 (EPA)	0.005 กรัม
22:5 n-3 (DPA)	0 กรัม
22:6 n-3 (DHA)	0.038 กรัม
คลอเรสเตอรอล	373 มิลลิกรัม
กรดอะมิโน	
ทริปโตแฟน	0.153 กรัม
ทรีโอนีน	0.604 กรัม
ไอโซลิวซีน	0.686 กรัม
ลิวซีน	1.075 กรัม
ไลซีน	0.904 กรัม
เมไทโอนีน	0.392 กรัม
ซิสทีน	0.292 กรัม
ฟีนิลอะลานีน	0.668 กรัม
ไทโรซีน	0.513 กรัม
วาเลีน	0.767 กรัม
อาร์จินีน	0.755 กรัม
ฮิสทีน	0.298 กรัม
อะลานีน	0.7 กรัม
กรดแอสพาร์ติก	1.264 กรัม
กรดกลูตามิก	1.644 กรัม
ไกลซีน	0.423 กรัม
โพรลีน	0.501 กรัม
ซีรีน	0.936 กรัม

ที่มา: USDA National Nutrient Database, 2016

Xie และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อต่อมวลชีวภาพเส้นใย และการผลิตสารภายในเซลล์ของเหาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้อาหารจากธรรมชาติคือข้าวกล้อง เบียร์เวิร์ท และน้ำกากถั่วเหลือง โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิ การหมัก พีเอชและปริมาณอาหาร มีผลต่อผลได้ของเส้นใยและสารในกระบวนการเมแทบอลิซึม งานวิจัยนี้ได้ใช้อัตราส่วนอาหารจากธรรมชาติที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเส้นใยและการผลิตสารคอร์โดเซปิน ซึ่งประกอบด้วย ข้าวกล้องร้อยละ 51 เบียร์เวิร์ทร้อยละ 5 และกากถั่วเหลืองร้อยละ 44 (มีการใช้เอนไซม์

และการใช้ความร้อนทำให้อาหารที่ใช้อยู่ในรูปของเหลวเพื่อต่อการเลี้ยงในสภาวะอาหารเหลว) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารคอร์โดเซปินสูงสุด และได้ปริมาณน้ำหนักรวมสูงสุด อาหารจากธรรมชาติเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและให้สารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเห็ดถึงเช่าสีทองเนื่องจากข้าวกล้องที่นำมาใช้จะประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จำนวนมาก และยังมีกรดฟอสฟอริก วิตามินอี วิตามินบี ในเปียร์เวิร์ดจะมีวิตามินอยู่หลายชนิด เช่น ไบโอดีน แพนโทธีแนต ไทอามีน ไพรีดอกซีน ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก กรดนิโคตินิก เป็นต้น และถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับจุลินทรีย์

Dong และคณะ (2012) ศึกษาผลของซีลีเนียมต่อสารออกฤทธิ์สำคัญของดอกเห็ดของ *Cordyceps militaris* ในการเพาะเลี้ยงแบบมีปริมาณซีลีเนียมสูงของ *C. militaris* กิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase (SOD)) และปริมาณคอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก ซีลีเนียมในรูปอินทรีย์ของดอกเห็ดขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมซีลีไนต์ (sodium selenite) ปริมาณอะดีโนซีนและโพลีแซคคาไรด์ เพิ่มขึ้นเมื่อเติมโซเดียมซีลีไนต์ลงในสารตั้งต้น แต่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมซีลีไนต์ ในการเพาะเลี้ยงด้วยข้าวสาลีที่มีการเติมโซเดียมซีลีไนต์ 18 ส่วนในล้านส่วน กิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส และปริมาณของคอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก โพลีแซคคาไรด์ และปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมซีลีเนียม และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณซีลีเนียมในรูปอินทรีย์กับ *Cordyceps sinensis* ก็พบว่ามีสูงกว่า (6.49 มิลลิกรัม/100 กรัม) เพราะฉะนั้นการเพาะเลี้ยงแบบมีปริมาณซีลีเนียมสูงมีศักยภาพในการผลิตอาหารเสริมเพื่อสุขภาพแทนที่ *C. sinensis* ได้

Dong และคณะ (2013) ศึกษาองค์ประกอบและการกระจายของสารออกฤทธิ์สำคัญในดอกเห็ดถึงเช่าสีทอง พบว่า แร่ธาตุต่างๆ ซึ่งได้แก่ ซีลีเนียม (Se; selenium) สังกะสี (Zn; zinc) เหล็ก (Fe; iron) และสารออกฤทธิ์หลักอย่างอะดีโนซีน (adenosine) คอร์โดเซปิน (cordycepin) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ส่วนใหญ่จะแพร่กระจายอยู่ในส่วนหัวของดอกเห็ด ส่วนฟอสฟอรัส (P; phosphorus) และ โพแทสเซียม (K; potassium) แพร่กระจายอยู่ทั่วดอกเห็ด

Wen และคณะ (2014) ทำการศึกษาการผลิตดอกเห็ดถึงเช่าสีทองให้ได้ปริมาณสารคอร์โดเซปินสูงสุดโดยได้ทำการศึกษาอาหารแข็ง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแหล่งเกลือแร่ จะทำการวัดปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากดอกเห็ดพบว่าการใช้อาหารแข็งเป็นข้าวกล้อง และแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส จะให้ปริมาณสารคอร์โดเซปินสูงสุดและการใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณอะดีโนซีนน้อยกว่าเปปโตเนและอีสต์สก็ดแต่ให้สารคอร์โดเซปินมากกว่า แหล่งเกลือแร่ใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจะให้ปริมาณคอร์โดเซปินสูงสุดและการใช้ แคลเซียมคลอไรด์ให้ปริมาณอะดีโนซีนสูงสุด

Dagley และคณะ (1950) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตระยะเริ่มต้นการเจริญของเชื้อ *Aerobacter aerogenes* พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อจะเจริญได้ดีถ้าใช้สารอาหารที่ใช้เลี้ยงหัวเชื้อและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเดียวกันนอกจากนี้แล้วอายุของเชื้อก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญการใช้เชื้อในช่วงระยะเริ่มต้นเข้าสู่การเจริญทวีคูณจะช่วยให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีเนื่องจากอยู่ในช่วงที่เชื้อจะเริ่มแบ่งเซลล์และสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญ

ตารางที่ 2.7 คุณค่าทางโภชนาการของนมผงต่อน้ำหนัก 100 กรัม

สารอาหาร	ปริมาณสารต่อหนึ่งหน่วย (100 กรัม)
การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร	
น้ำ	15 กรัม
พลังงาน	411 กิโลแคลอรี / 1720 กิโลจูล
โปรตีน	45.71 กรัม
ไขมันทั้งหมด	17.14 กรัม
เถ้า	3.65 กรัม
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	18.5 กรัม
เส้นใย	7.1 กรัม
น้ำตาลทั้งหมด	5.71 กรัม
แร่ธาตุแต่ละชนิด	
แคลเซียม	500 มิลลิกรัม
เหล็ก	8.57 มิลลิกรัม
แมกนีเซียม	200 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	643 มิลลิกรัม
โพแทสเซียม	1129 มิลลิกรัม
โซเดียม	329 มิลลิกรัม
สังกะสี	7.14 มิลลิกรัม
ทองแดง	1 มิลลิกรัม
ซีลีเนียม	33.8 ไมโครกรัม
วิตามินแต่ละชนิด	
วิตามินซี	30 มิลลิกรัม
วิตามินบี 1 (ไทอะมีน)	0.714 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2 (ไรโบฟลาวิน)	0.857 มิลลิกรัม
วิตามินบี 3 (ไนอะซิน)	10 มิลลิกรัม
วิตามินบี 5 (กรดแพนโทเทนิก)	5.714 มิลลิกรัม
วิตามินบี 6	1 มิลลิกรัม
ปริมาณโฟเลตรวม	200 ไมโครกรัม
กรดโฟลิก	200 ไมโครกรัม
โฟเลต	0 ไมโครกรัม
ปริมาณโคลีนรวม	81.6 มิลลิกรัม
วิตามินบี 12	3 ไมโครกรัม
วิตามินบี 12 (เต็ม)	3 ไมโครกรัม
วิตามินเอ	750 ไมโครกรัม RAE หรือ 2500 IU
เรตินอล	750 ไมโครกรัม

เบต้าแคโรทีน	0 ไมโครกรัม
แอลฟาแคโรทีน	0 ไมโครกรัม
เบต้าคริปโตแซนทีน	0 ไมโครกรัม
ไลโคปีน	0 ไมโครกรัม
ลูทีนและซีแซนทีน	0 ไมโครกรัม
วิตามินอี (อัลฟาโทโคฟีรอล)	7.07 มิลลิกรัม
วิตามินอี (เต็ม)	7.07 มิลลิกรัม
วิตามินดี (ดี 2 และ 3)	5 ไมโครกรัม
วิตามินดี3	5 ไมโครกรัม
วิตามินดี	200 IU
วิตามินเค1 (ฟิลโลควิโนน)	0.5 ไมโครกรัม
ไขมัน	
กรดไขมันอิ่มตัวทั้งหมด	1.553 กรัม
4:00	0 กรัม
6:00	0 กรัม
8:00	0 กรัม
10:00	0 กรัม
12:00	0 กรัม
14:00	0 กรัม
16:00	0.621 กรัม
18:00	0.932 กรัม
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมด	12.105 กรัม
16:1	0 กรัม
18:1	11.64 กรัม
20:01	0.309 กรัม
22:1	0.156 กรัม
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนทั้งหมด	1.77 กรัม
18:2	1.709 กรัม
18:3	0.061 กรัม
คลอเรสเตอรอล	21 มิลลิกรัม

ที่มา: USDA National Nutrient Database, 2016

Hur (2008) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคอร์โคโรไดเซป็นในเห็ดถั่งเช่าธิเบต โดยได้ทำการนำตัวอย่างเส้นใยอบแห้งมาสกัดด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองผ่านเยื่อกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ใช้เมทานอลต่อ 0.02 มิลลิลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(15:85) เป็นเฟสเคลื่อนที่ คอลัมน์ที่ใช้เป็น column Cosmosil 5C18 (4.6_250 มิลลิเมตร, 5 มิลลิเมตร particle size) นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC วัดที่ความยาวคลื่น 260nm โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้วิธี isocratic (เป็นการใช้สัดส่วน

ตัวทำละลายเคลื่อนที่ คงที่ตลอดการวิเคราะห์ซึ่งอาจจะทำละลายเคลื่อนที่ชนิดเดียว หรือ ทำละลายเคลื่อนที่หลายชนิดผสมกันได้แต่ ต้องเป็นสัดส่วนที่คงที่ไม่มีเปลี่ยนแปลงตลอดการวิเคราะห์)เป็นเวลา 15 นาทีโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เมทานอลร้อยละ 30 หลังจากนั้นที่ 20 นาที เปลี่ยนเป็นเมทานอล 40% นาทีที่ 30 เปลี่ยนเป็นเมทานอลร้อยละ 45 นาทีที่ 50 เปลี่ยนเป็นเมทานอลร้อยละ 60 นาทีที่ 52 เปลี่ยนเป็นเมทานอลร้อยละ 80 ก็จะเป็นการชะแบบ isocratic เป็นเวลา 60 นาที

Li และคณะ (2010) ได้ศึกษาการผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก(Gamma-aminobutylic acid)โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus brevis* NCL912 โดยใช้การหมักแบบกึ่งกะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริกจากการศึกษาจะใช้หัวเชื้อที่อยู่ในช่วงระยะเริ่มเข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณ(early exponential phase)ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5 สภาวะเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก

Dan และคณะ (2012) การวิเคราะห์ปริมาณของคอร์โดเซพินและ อะดีโนซีน โดยการ ultrasonicate ตัวอย่าง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อสกัดคอร์โดเซพินและ อะดีโนซีน โดยคอร์โดเซพินและ อะดีโนซีน จะถูกแยกด้วย HPLC ที่มี calibration curve ดังนี้ อะดีโนซีนมีค่าเท่ากับ A018,142C-3,345.3, r00.9988 มีค่าช่วงเชิงเส้น(linearity range) เท่ากับ 50-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนคอร์โดเซพินมีค่าเท่ากับ A09,607.8C+243.4, r00.9981 มีค่าช่วงเชิงเส้นเท่ากับ 50-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Kumar และคณะ (2013) ทำการทดลองในการวิเคราะห์ปริมาณอะดีโนซีนและคอร์โดเซพินจากเห็ดถั่งเช่า โดยใช้ 486 photo-diode array detector (ตัวตรวจจับ) ใช้คอลัมน์ C18 protoSIL reversed-phase column (250×4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) นำสารมาตรฐานคอร์โดเซพินและอะดีโนซีนฉีดเข้า HPLC ปริมาตร 3, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร ใช้ เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอลต่อน้ำ 20:80 อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที วัดที่ความยาวคลื่น 254นาโนเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร

Jing และคณะ (2013) ได้ทำการสกัดคอร์โดเซพินจากผงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งโดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ,1, 20, 30 ,40 ,50, 60, 70, 80, 90 และ 100(ปริมาตรต่อปริมาตร) เจือจางด้วยน้ำกลั่น นำผงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมา 0.5 กรัม ผสมกับเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปเข้าเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง ultrasonic (Shenzhen Jietai Ultrasonic cleaningapparatus Co. Ltd., Shenzhen, China, PS-40, 40 kHz, 240 W) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนปั่นเหวี่ยงที่ 3250xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

Yi และคณะ (2014) ได้ทำการสกัดคอร์โดเซพินจากผงดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งโดยใช้น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำ 4 ส่วนผสมให้เข้ากันและนำไปเข้าเครื่อง ultrasonic (100w) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สารสกัดที่ได้จะกรองผ่านด้วยกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร วิเคราะห์โดยเครื่อง shimazu SPD-20A HPLC system และ LC-20AT UV detector(Shimazu Co., Kyoto, Japan), ใช้ YMC-packed ODS

column (4.6x250นาโนเมตรและ 0.5 ไมโครเมตร) และเฟสเคลื่อนที่ใช้เป็นเมทานอลร้อยละ 20 วัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ขวดเพาะเลี้ยง 6 ขวดในแต่ละ การทดลอง ข้อมูลที่ได้ค่าเฉลี่ยในทั้งสามซ้ำ \pm SE(ค่าความผิดพลาด) การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS (SPSS Inc.,) ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 5

Wang และ คณะ (2014) ทำการศึกษาวิธีการสกัดสารคอร์โดเซปินจากเห็ดถึงเช่าสีทองโดยใช้ น้ำบริสุทธิ์สูงและใช้เครื่องความถี่สูง(ultrasonic)โดยได้ศึกษาปัจจัยที่สำคัญดังนี้ อุณหภูมิ ความถี่ และระยะเวลาในการสกัด ผลที่ได้พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียสสารคอร์โดเซปินมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจนลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 70 องศาเซลเซียส จากการสกัดด้วยเครื่องความถี่สูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อผ่านไป 60 นาทีสารคอร์โดเซปินเพิ่มขึ้นแต่เริ่มเพิ่มน้อยลงจนไม่มีความแตกต่างกันกับการสกัดเป็นเวลา 90 นาที และความถี่ที่ให้สารคอร์โดเซปินมากที่สุด คือ 56kHz

Li และคณะ (2015) ทำการศึกษาผลกระทบของการทำอาหารที่มีผลต่อ ปริมาณของอะดีโนซีนและคอร์โดเซปิน ด้วยวิธี HPLC โดยใช้ ZORBAX SB-C18 (5 ไมโครเมตร, 4.6x150 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำบริสุทธิ์ (16:84) ในอัตราการใช้ 1 มิลลิลิตร / นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 27 องศาเซลเซียส และปริมาณการไหลต่อตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นรังสียูวีที่ 260 นาโนเมตร พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การสกัดสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินอยู่ที่ 20-40 องศาเซลเซียสถ้าสูงไปกว่านี้สารอะดีโนซีนจะลดลงอย่างมากทำให้เสียสรรพคุณทางยาของเห็ดถึงเช่าสีทองเมื่อนำไปประกอบอาหารในขณะที่สารคอร์โดเซปินมีปริมาณสารที่คงที่กว่าเมื่อใช้อุณหภูมิสูง และระยะเวลา

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุดิบ

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ไข่ นมผง และกากถั่วเหลือง

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.2.1 Potato Dextrose Agar

3.2.2 Potato Dextrose Broth

3.3 อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ
2. ตู้เย็น
3. เครื่องเขย่า (shaker บริษัท penta metrology co.,LTD)
4. เครื่องชั่งสาร
5. HPLC (บริษัท shimadzu Corporation)
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค
7. ขวดรูปชมพู่
8. ขวดแก้วแบน
9. ปีกเกอร์
10. หลอดทดลอง
11. กระจกตวง
12. ลูบเปียเชื้อ
13. ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยง
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. จานเพาะเชื้อ
16. ผ้าขาวบาง
17. เครื่องหมุนปั่นเหวี่ยง(centrifuge)
18. เครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง(Ultrasonic Sonicator)

3.4 สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
2. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
3. เปปโตน (Peptone)
4. กลูโคส
5. พงวุ้น (Agar)
6. น้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure)

3.5 วิธีการเตรียมหัวเชื้อ

3.5.1 วิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.5.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อเห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps militaris*) เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเส้นใยใน เพาะเลี้ยงในหนอนไหมร้อยละ 100 จนเกิดเป็น fruiting body และนำ fruiting body ที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นๆ ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่หลอดเก็บเชื้อที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 10 และหนอนไหม 0.02 กรัมต่อลิตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ใช้ในครั้งถัดไป

3.5.1.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA

หัวเชื้อเริ่มต้นจาก fruiting body ที่ใช้ตัวหนอนในการเลี้ยงจากขั้นตอนที่ 3.5.1.1 นำดอกเห็ดมาฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นๆ ชิ้นละประมาณ 1 เซนติเมตรนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ทำเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 14-15 วันเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA ในขั้นตอนที่ 3.5.1.2 นำมาตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น มาทำการเลี้ยงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.5.3 การศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของหัวเชื้อ

3.5.3.1 ทำการศึกษาอัตราการเจริญในระยะเวลาเอกโพแนสเซียลของ *C. militaris* ในอาหารเหลว

ทำการทดลองโดยเลี้ยงหัวเชื้อ ตามขั้นตอนที่ 3.5.2 บนสภาวะเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วทำการเก็บตัวอย่างหัวเชื้อเพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกน้ำหนักแห้งของหัวเชื้อโดยสุ่มตัวอย่างมาซ้ำละ 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศา

เซลเซียส จากนั้นเทส่วนผสมทิ้ง แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำกลั่น 1 รอบ จากนั้นเทส่วนผสมทิ้ง นำเข้าตู้อบลมร้อน ที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

3.6 การแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสู่สีทอง

ทำการแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน คือ ไข่ไก่สด นมผง และกากถั่วเหลือง แทนการใช้เปปโตเนและยีสต์สกัด

ส่วนที่ 1 เตรียมอาหารโดยการนำข้าวไรซ์เบอร์รี่ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยง ขนาดละ 40 กรัม ส่วนที่ 2 ทำการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง PDB เสริม สูตรดังจากภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้านำอาหาร PDB เสริม ที่เตรียมได้ ใส่ลงไปในขวดอาหารที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงต่างๆ ชนิดละ 3 ซ้ำ โดยพิจารณาให้ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ที่ร้อยละ 60 และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสม แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นทำการหาปริมาณความชื้น แล้วนำหัวเชื้อเห็ดถึงเข้าสู่สีทองใส่ลงอาหารเพาะเลี้ยงโดยใส่หัวเชื้อไปที่บริเวณ กึ่งกลางของขวดอาหาร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด (โดยวิธีปลอดเชื้อ)

3.6.1 วิธีการเพาะเลี้ยง

3.6.1.1 ขวดอาหารเพาะเลี้ยงที่ใส่หัวเชื้อจากหัวข้อ 3.6.1 นำบ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 20 ± 5 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-65 และเลี้ยงไว้ในที่มีดจนเชื้อเห็ดเส้นใยสีขาวเดินจนเต็มพื้นที่ของอาหารเพาะเลี้ยง (ใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์)

3.6.1.2 การให้แสง

ขวดอาหารที่เส้นใยสีขาวเดินจนเต็มอาหารแล้ว นำมาให้แสงไฟแอลอีดีสีขาวและสีส้มเพื่อให้แสงกระตุ้นให้เส้นใยสร้างสารสำคัญ ปรับอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 18-22 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-65 เมื่อเส้นใยสีขาวถูกแสงแล้วเส้นใยสีขาวจะเปลี่ยนเป็นสีทองหรือสีส้มแล้วทำการเก็บเกี่ยว

3.7 การเตรียมตัวอย่างเห็ดถึงเข้าสู่สีทองเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี

3.7.1 ทำการเก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดถึงเข้าสู่สีทองแล้วนำไปชั่งน้ำหนักจากนั้นนำไปอบแห้งในตู้เย็นเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละชนิด ไปอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดโดยใช้โกร่งให้เป็นผงละเอียด

3.7.2 ขั้นตอนการสกัด

การสกัดโดยใช้น้ำบริสุทธิ์สูงเป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 (เส้นใยเห็ดถั่งเช่า : น้ำบริสุทธิ์สูง) ชั่งเส้นใยเห็ดถั่งเช่า จำนวน 1 กรัม เติมน้ำบริสุทธิ์สูง จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator) 50 เฮิรท์ 50 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 20 นาที แยกตะกอนกับส่วนใส จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านขวดลดความดัน (suction flask) โดยใช้กระดาษ whatman เบอร์ 4 แล้วนำส่วนใสที่ได้ใส่ในขวดแก้วเล็กหุ้มขวดด้วยกระดาษ ฟลอยด์เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น แล้วนำไปฉีดสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC)) โดยใช้คอลัมน์ C18 (ขนาด 3.5 ไมโครเมตร×250 มิลลิเมตร×4.6 มิลลิเมตร) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ฉีดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ใช้ เมทานอลต่อน้ำบริสุทธิ์ อัตราส่วน 15:85 (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015)

3.7.3 การวิเคราะห์สารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูง (HPLC)

1. ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้เครื่อง HPLC แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟมาทำโครมาโทแกรมจะได้กราฟมาตรฐานสมการเส้นตรงของสารคอร์โดเซปินมาตรฐาน จะได้สมการเส้นตรง คือ $Y = mX+c$ (ดังภาคผนวก ค)

2. ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการสกัดหัวข้อที่ 3.7.2 ของอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนต่างๆ โดยใช้เครื่อง HPLC แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟโดยการนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารคอร์โดเซปินที่วัดได้แทนในสมการเส้นตรงดังสมการ โดยกำหนดให้ Y คือ ค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟ และ X คือ ปริมาณสารคอร์โดเซปินหรืออะดีโนซีน

3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

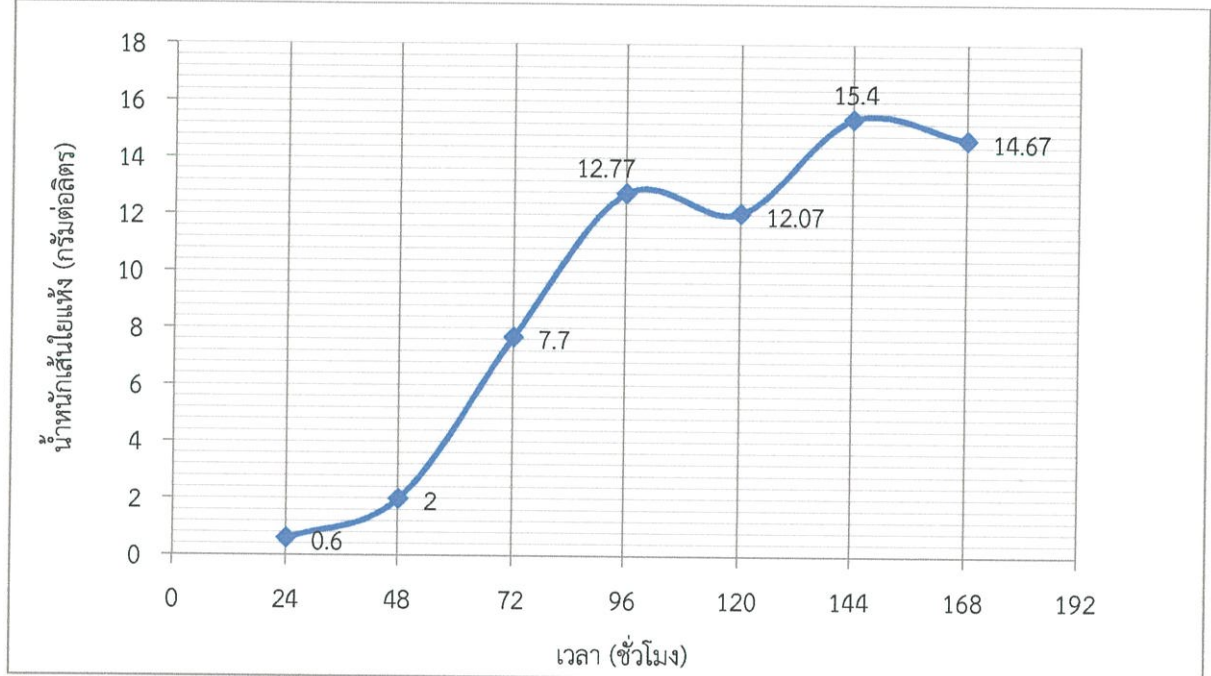
ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS โดยใช้ Duncan's New Multiple Range method เพื่อหาน้ำหนักแห้งที่ระยะต้น กลาง และปลายของระยะแอกโทแนนเซียลในการเพาะเลี้ยงหิวเชื้อด้วยอาหาร PDB ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และการศึกษาปริมาณสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนของอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนต่างๆ ใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) และ Duncan's New Multiple Range method วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธีทางสถิติ ANOVA โดยทั้งสองหัวข้อจะใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสภาวะและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหัวเชื้อ

การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของน้ำหนักเส้นใยแห้งในการเลี้ยงหัวเชื้อในระยะเวลา 7 วัน โดยทำการทดลองแบบ CRD และทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS โดยใช้ Duncan's New Multiple Range method ผลการทดลองพบว่าเห็ดถึงเข้าสีทองเริ่มเข้าสู่ระยะเจริญทวีคูณในวันที่ 2 (48 ชั่วโมง) และเส้นใยจะมีปริมาณสูงสุดที่ 15.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 (144 ชั่วโมง) แล้วเข้าสู่ระยะเจริญคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



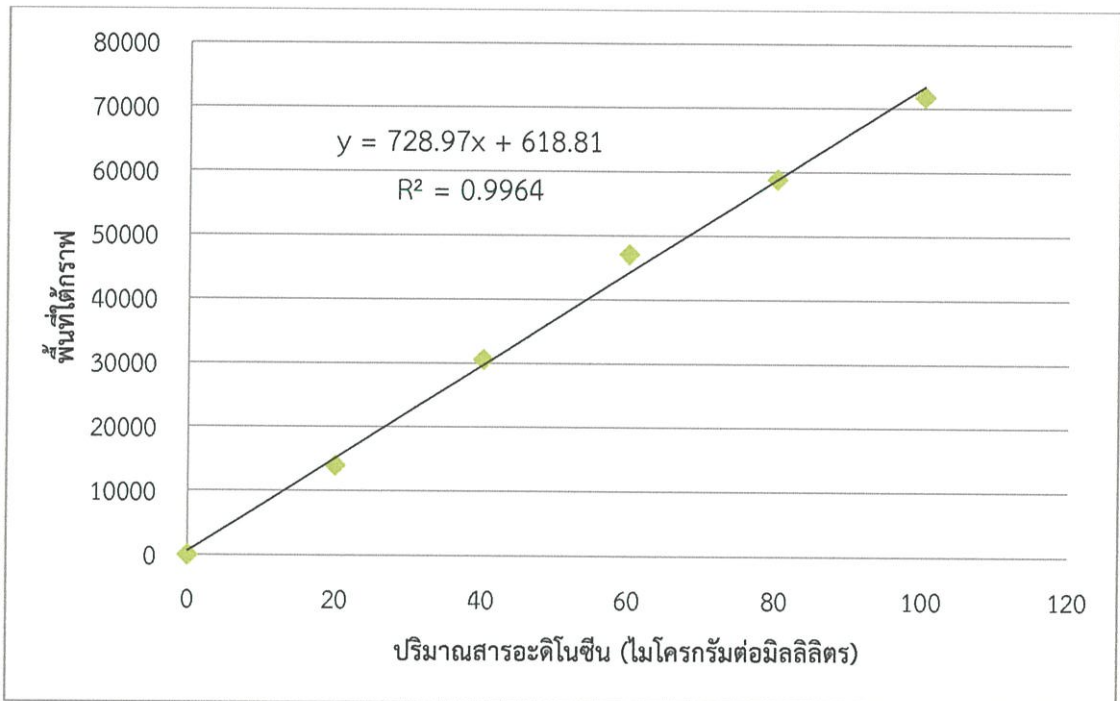
รูปที่ 4.1 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเห็ดถึงเข้าสีทอง ที่สภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที

ดังนั้นการศึกษาระยะการเจริญของเชื้อเห็ดถึงเข้าสีทองจึงเลือกเอาช่วงวันที่ 2 (48 ชั่วโมง) เนื่องจากเป็นช่วงระยะเริ่มต้นเข้าสู่ระยะเจริญทวีคูณ ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีความพร้อมในการเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วบนผิวของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (ข้าวไรซ์เบอร์รี่) และทำการทดลองเบื้องต้นต่อไปพบว่าเชื้อเจริญดีที่สุดในหัวเชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากงานวิจัยการผลิตแกมมาอะมิโนบิวทีริกแอซิด (gamma-aminobutylic acid) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิของเชื้อ *Lactobacillus brevis* NCL912 พบว่าการใช้หัวเชื้อที่อยู่ในระยะเจริญทวีคูณจะให้สารทุติยภูมิมากที่สุด (Li และคณะ, 2010) จากงานวิจัยการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อ *Aerobacter aerogenes* ระยะเริ่มต้นการเจริญทวีคูณพบว่าในระยะนี้เซลล์จะเริ่มแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและเริ่มสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญดังนั้นจึงเหมาะแก่การใช้เป็นหัวเชื้อที่สุด (Dagley และคณะ, 1950)

4.2 การแปรผันแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเช่าสีทองและการสกัดเส้นใยถึงเช่าสีทองที่มีผลต่อปริมาณของสารอะดีโนซีน

จากผลการตรวจสอบปริมาณสารอะดีโนซีนโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูงโดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาจากรูปที่ 4.2 แทนค่าในสมการที่ 4.1

$$Y = 728.97X + 618.81 \quad (4.1)$$



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

เมื่อนำปริมาณสารอะดีโนซีนที่ได้มาทำวิเคราะห์สถิติแบบแพคทอเรียลระหว่าง 2 ปัจจัย คือ แหล่งอินทรีย์ในโตรเจน และการสกัดดังที่แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าทั้งสองปัจจัยไม่มีผลต่อกันที่ระดับนัยสำคัญ(α) เท่ากับ 0.05 จึงสามารถทำการศึกษาแยกปัจจัยได้ดังนี้

4.2.1. การแปรผันแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อปริมาณของสารอะดีโนซีน

เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมแล้วพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ไข่ และนมผงมีปริมาณของสารอะดีโนซีนคือ 129.83 และ 140.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้กากถั่วเหลืองมีปริมาณสารอะดีโนซีน คือ 52.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตาราง

4.2 จากงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยน้ำมันถั่วเหลืองพบว่าได้ปริมาณสารอะดีโนซีนน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงด้วยเบปโตเนและยีสต์สกัด (wen และคณะ, 2014) สารอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตสารของเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยซีลีเนียมซึ่งพบในไข่ไก่และนมผงจะเพิ่มผลผลิตของกรดอะมิโนอะดีโนซีน (Dong และคณะ, 2012)

ตารางที่ 4.1 แสดงการทดสอบอิทธิพลร่วมระหว่างของแหล่งไนโตรเจนและการสกัดของสารอะดีโนซีน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41697.288 ^a	7	5956.755	7.856	.000
Intercept	310300.945	1	310300.945	409.214	.000
แหล่งไนโตรเจน	30765.437	3	10255.146	13.524	.000
การสกัด	8188.120	1	8188.120	10.798	.005
แหล่งไนโตรเจน* การสกัด	2743.731	3	914.577	1.206	.339
Error	12132.557	16	758.285		
Total	364130.790	24			
Corrected Total	53829.845	23			

หมายเหตุ ค่า R-Squared คือ 0.775 (ค่า Adjusted R-Squared คือ 0.676)

โดยที่ Type III Sum of Squares คือ ค่าผลรวมกำลังสองของการแปรผัน
 Df คือ ค่าองศาของความเป็นอิสระ
 Mean Square คือ ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวน
 F คือ ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบ
 Sig. คือ ค่าระดับนัยสำคัญ

4.2.2 การสกัดเส้นใยถั่งเช่าสีทองที่มีผลต่อปริมาณของสารอะดีโนซีน

จากการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงทั้ง 2 วิธีคือ การสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที และการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี t-test พบว่าการสกัดด้วยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิตรวจพบสารอะดีโนซีนเท่ากับ 132.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปริมาณสารที่ได้จากการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารอะดีโนซีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทองในแหล่งไนโตรเจนได้แก่ ไข่ไก่ นมผง กากถั่วเหลือง และชุดควบคุม(เปปโตเนและยีสต์สกัด)

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณสารอะดีโนซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ชุดควบคุม	132.63 ^a
ไข่ไก่	129.83 ^a
นมผง	140.27 ^a
กากถั่วเหลือง	52.05 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณอะดีโนซีนที่สกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงด้วยวิธีใช้เครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูงและอ่างควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการสกัด	จำนวนซ้ำของตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	12	132.18 ^a
เครื่องเขย่าคลื่นเสียง ความถี่สูง	12	95.24 ^b

ที่ระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

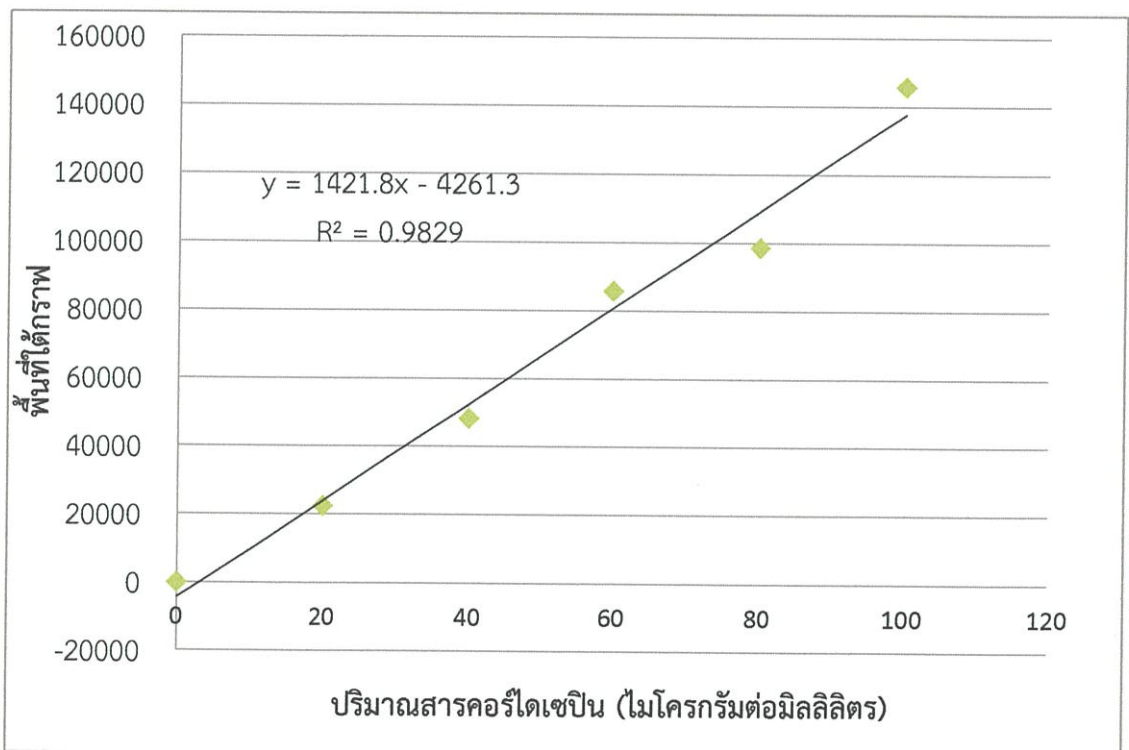
4.3 ผลของการแปรผันแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทองและการสกัดเส้นใยถึงเข้าสีทองต่อปริมาณสารคอร์โดเซปิน

จากผลการตรวจสอบปริมาณสารคอร์โดเซปินโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวแบบสมรรถภาพสูงโดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาจากรูปที่ 4.3 แทนค่าในสมการที่ 4.2

$$Y = 1421.8X - 4261.3 \quad (4.2)$$

เมื่อนำปริมาณสารคอร์โดเซปินที่ได้มาทำวิเคราะห์สถิติแบบแฟคทอเรียลระหว่าง 2 ปัจจัยคือ แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และวิธีการสกัด ในตารางที่ 4.4 พบว่าทั้งสองปัจจัยส่งผลต่อกันระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงต้องทำการศึกษาร่วมกัน จึงทำการพิจารณาจากแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆที่นำมาทำการทดลองและการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากผลการทดลองจะพบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้ไข่ และทำการสกัดด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะมีปริมาณสารคอร์โดเซปินสูงสุดคือ 67.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และลำดับถัดมาคือ ชุดควบคุม (การเพาะเลี้ยงด้วยเปปโตเนและยีสต์สกัด)จะมีปริมาณสารคอร์โดเซปินเท่ากับ 54.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่ให้ค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเลี้ยงด้วยนมผงและกากถั่วเหลืองจากงานวิจัยก่อนหน้ามีผลการศึกษาร่วมกันที่ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทอง

หลายอย่างเช่น ปริมาณซีลีเนียมซึ่งมีผลต่อปริมาณสารคอร์โดเซปิน (Dong และคณะ, 2012) เป็นแร่ธาตุที่พบในไขไก่และนมผง กรดไลโนเลอิกและกรดพาลมิติกที่พบในไขไก่เพิ่มประสิทธิภาพการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Park, 2002) และกรดอะมิโนไกลซีน ซีรีน และซีสทีนที่พบในไขไก่ส่งเสริมการเจริญของเห็ดถั่งเช่าสีทองและการผลิตคอร์โดเซปิน (Mao และ Zhong, 2006) นอกจากนี้การสกัดเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยวิธีที่ต่างกันและเวลาต่างกันผลที่ได้อาจสืบเนื่องมาจากระยะเวลาการสกัดด้วย จากการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการสกัดคอร์โดเซปินจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ความถี่ 54 กิโลเฮิร์ตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสถ้าใช้เวลาการสกัดเป็นเวลา 60 นาที จะให้ปริมาณสารมากกว่าการสกัดเป็นเวลา 30 นาที โดยปริมาณสารที่ได้จะคงที่จนถึงเวลา 90 นาที (Wang และคณะ, 2014) แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็งโดยใช้ข้าวไรซ์เบอร์รี่และใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆที่ผลิตในประเทศไทยทดแทนแหล่งไนโตรเจนอย่าง เปปโตน และยีสต์สกัด ซึ่งมีผลต่อปริมาณคอร์โดเซปินและอะดิโนซีน โดยจากผลการวิจัยพบว่าสามารถใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนคือ ไข่ไก่และนมผง ในการทดแทนเปปโตนและยีสต์ได้ ส่วนกากถั่วเหลืองสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงได้เช่นกันแต่อาจได้ปริมาณสารคอร์โดเซปินน้อยกว่า และวิธีการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองต้องคำนึงถึงหลายปัจจัยทั้งระยะเวลาการเตรียมหัวเชื้อ พีเอช ความชื้น ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและส่วนประกอบอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Tuli และคณะ, 2014) ดังเช่นที่ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคืออัตราการเจริญเติบโตของหัวเชื้อที่เลือกในช่วงเริ่มต้นเข้าสู่ระยะเพิ่มแบบทวีคูณที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานของสารคอร์โดเซปินที่ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

หากนำหัวเชื้อในช่วงเวลานี้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนและมีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่พบว่ามีผลดีต่อการเจริญเติบโตกว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (Tuli และคณะ, 2014) โดยทำการทดแทนเปปโตเนและยีสต์สกัดด้วยแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจากธรรมชาติ ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการใช้น้ำกากถั่วเหลืองในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว (Xie และคณะ, 2009) รวมทั้งในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในเชิงการค้าในประเทศไทยก็มีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากนมผง (ธัญญา, 2555) และไข่ (วิลาวัลย์และคณะ, 2557) โดยจากผลการวิจัยสามารถพิสูจน์ได้ว่า การใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจากธรรมชาติสามารถทดแทนการใช้เปปโตเนและยีสต์สกัดได้โดยไม่ส่งผลต่อการผลิตสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตารางที่ 4.4 การทดสอบอิทธิพลร่วมระหว่างของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและการสกัดของสารอะดีโนซีน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7284.005 ^a	7	1040.572	8.408	.000
Intercept	30571.340	1	30571.340	247.019	.000
แหล่งไนโตรเจน	4284.901	3	1428.300	11.541	.000
การสกัด	468.255	1	468.255	3.784	.070
แหล่งไนโตรเจน* การสกัด	2530.849	3	843.616	6.816	.004
Error	1980.177	16	123.761		
Total	39835.522	24			
Corrected Total	9264.182	23			

หมายเหตุ ค่า R Squared คือ 0.786 (ค่า Adjusted R Squared คือ 0.693)

โดยที่ Type III Sum of Squares คือ ค่าผลรวมกำลังสองของการแปรผัน
 Df คือ ค่าองศาของความเป็นอิสระ
 Mean Square คือ ค่าเฉลี่ยของความแปรปรวน
 F คือ ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบ
 Sig. คือ ค่าระดับนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสารคอร์โดเซปินที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเห็ดถังเช่าสีทองในแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดและสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูง 2 วิธี

แหล่ง N วิธีการสกัด	ชุดควบคุม	ไข่ไก่	นมผง	กากถั่วเหลือง
	ปริมาณสารคอร์โดเซปิน(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)			
เครื่องเขย่าคลื่น เสียงความถี่สูง	54.37 ^{ab}	30.96 ^{cd}	26.14 ^{cd}	13.62 ^d
อ่างควบคุม อุณหภูมิ	34.73 ^{bcd}	67.16 ^a	43.49 ^{bc}	15.05 ^d

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจากธรรมชาติที่ผลิตในประเทศไทยทดแทนแหล่งไนโตรเจนอย่าง เปปโตน และยีสต์สกัด ส่งผลต่อปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน โดยจากผลการวิจัยพบว่าสามารถใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน คือ ไข่และนมผง ในการทดแทนเปปโตน และยีสต์ได้ ส่วนกากถั่วเหลืองสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงได้เช่นกันแต่อาจได้ปริมาณคอร์โดเซปินน้อยกว่า และวิธีการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยเครื่องเขย่าคลื่นเสียงเป็นเวลา 30 นาที โดยพบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้นมผงและทำการสกัดด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จะมีปริมาณสารอะดีโนซีนสูงสุดเท่ากับ 140.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการเพาะเลี้ยงโดยใช้ไข่และทำการสกัดด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ให้ปริมาณสารคอร์โดเซปินสูงสุดเท่ากับ 67.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองมีค่าความคลาดเคลื่อนซึ่งอาจเกิดจากในขั้นตอนสกัดสาร ความร้อนเข้าไม่ถึงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองเนื่องจากเส้นใยจับตัวกันแน่นเพราะฉะนั้นในวิธีการสกัดควรทำการสกัดในสภาวะเขย่า

เอกสารอ้างอิง

- กองบรรณาธิการการเกษตร.2557. ไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหอมสายพันธุ์ใหม่ พลิกชีวิตชาวนาไทย, กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์ปัญญาชน, 40-47
- กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2542. ถั่วเหลืองแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์.[online].Avaliable :http://nutrition.dld.go.th/Nutrition_Knowledge/ARTICLE/ArtileP.htm (สืบค้นวันที่ 15 พฤษภาคม 2559)
- ณัฐชัย เตชะจิรกกุล. 2554. วิตามินเอ.[Online].Avaliable :<http://sirinpharmacy.exteen.com/20110510/entry> (สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. การเพาะเห็ดถั่งเช่าเป็นอาชีพ. มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่,เชียงใหม่. 94 (นिरนาม). 2556. ประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่. [online].Avaliable :<http://www.thaihealth.or.th/Content/6908-ประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่.html> (สืบค้นวันที่ 25 พฤษภาคม 2559)
- (นिरนาม). 2556. เห็ดถั่งเช่าสีทอง. (*Cordyceps militaris*).[online].Avaliable :<http://www.greenclinic.in.th/cordycepsmilitaris.html> (สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- (นिरนาม). 2558. Fit athletes derive more benefit from testosterone boosters *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma lucidum*. [online].Avaliable :<http://www.ergo-log.com/fit-athletes-derive-more-benefit-from-testosterone-boosters-cordyceps-sinensis-and-ganoderma-lucidum.html> (สืบค้นวันที่ 19มิถุนายน 2559)
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, นิตยา รัตนาปนนท์. 2559. International Unit (I.U.) / หน่วยวัดมาตรฐานสากล.[Online].Avaliable:<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2259/international-unit-i-u-หน่วยวัดมาตรฐานสากล> (สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- พรพจน์ ศรีสุขชะกุล. 2556. บีตา-กลูแคนสารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ. [Online]. Avaliable:<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1088/beta-glucan>. (สืบค้นวันที่ 15 มิถุนายน 2559)
- ลุงหยุด แซ่มประเสริฐ. 2556. การอบรมการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า. [Online]. Avaliable :http://www.ifarm.co.th/index.php?option=com_content&view=article&id=80&Itemid=321. (สืบค้นวันที่ 15 มิถุนายน 2559)
- วิลาวัลย์ ผดุงศักดิ์สิน, ศุภาวรรณ วิจิตรสารและ อรพรรณ โถน้อย. 2557. การผลิตสารคอร์ไดเซปิน และเส้นใยแห้งของ *Cordyceps militaris* เมื่อใช้สารอินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติในการเพาะเลี้ยง[วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี].กรุงเทพฯ:สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

- Chang, Y., Jeng, K.C., Huang, K.F., Lee, Y.C., Hou, C.W., Chen, K.H., Cheng, F.Y., Liao, J.W., Chen, Y.S. 2008. Effect of *Cordyceps militaris* supplementation on sperm production, sperm motility and hormones in Sprague-Dawley rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 36(5): 59-849.
- Cheng, J.H., Guo, X.M. and Wang, X. 1995. Analysis of Therapeutic Effects of Jinshuibao capsule in adjuvant treatment of 20 patients with terminal stage of lung cancer. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 5: 30-35.
- Chou, S.M., Lai, W.J., Hon, T.W., Lai, J.Y., Tsai, S.H., Chen, Y.H., Yu, S.H., Kao, C.H., Chu, R., Ding, S.T., Li, T.K., Shen, T.L. 2014. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. *Phytomedicine*. 21(12): 24-1516.
- Dagley, S., Dawes, E. A., Morrison, G. A. 1950. Factors Influencing the Early Phases of Growth of *Aerobacter aerogenes*. Department of Biochemistry, School of Medicine, Lees 1:437-443.
- Das, K.S., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 81: 961-968.
- Dong, J.Z., Ding, J., Yu, Z.P., Lei, C., Zheng, J.X. and Wang, Y. 2013. Composition and distribution of the main active components in selenium-enriched fruit bodies of *Cordyceps militaris* link. *Food Chemistry*. 137: 164-167.
- Dong, J. Z., Lei, C., Ai, X. R., & Wang, Y. 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 1215–1224.
- Fan, D.D., Wang, w., Zhong, J.J. 2013. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrus sulfate. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 30-35.
- Gu, Y.X., wang, Z.S., Li, S.X., Yuan Q.S. 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry*. 102: 1304–1309.
- Guo, Y.Z. 1986. Medicinal chemistry, pharmacology and clinical applications of fermented mycelia of *Cordyceps sinensis* and JinShuBao capsule. *Journal of Modern Diagnostics and Therapeutics*. 1: 60-65.
- Hao, L., Wang, I., Kobayashi, M., Tamesada, M. and Wang, H.J. 2008. Effectiveness of *Cordyceps sinensis* alone or in combination with chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Biotherapy*. 22: 345-349.

- He, W., Zhang, M.F., Ye, J., Jiang, T.T., Fang, X., Song, Y. 2010. Cordycepin induces apoptosis by enhancing JNK and p38 kinase activity and increasing the protein expression of Bcl-2 pro-apoptotic molecules. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 11: 6-654.
- Hur, H. 2008. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 36(4): 233-235
- Jing Z., Dong, S.H., Wangb, X.R., Aia, L.Z., Zi, W.S., Lei, C., Ying, W., Qing, W. 2013. Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies. *Journal of functional food*. 5: 1450-1455.
- Jordan, J.L., Nowak, A. and Lee, T.D. 2010. Activation of innate immunity to reduce lung metastases in breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 59(5): 789-797.
- Jung, S.M, Park, S.S., Kim, W.J., Moon S.K. 2012. Ras/ERK1 pathway regulation of p27KIP1-mediated G1-phase cell-cycle arrest in cordycepin-induced inhibition of the proliferation of vascular smooth muscle cells. *The European Journal of Pharmacology*. 681: 15–22.
- Kim, J.R., Yeon, S.H., Kim, H.S., Ahn, Y.J. 2002. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Management Science*. 58(7): 7-713.
- Kim, S.B., Ahn, B., Kim, M., Ji, H.J., Shin, S.K., Hong, I.P., Kim, C.Y., Hwang, B.Y., Lee, M.K. 2014. Effect of *Cordyceps militaris* extract and active constituents on metabolic parameters of obesity induced by high-fat diet in C58BL/6J mice. *Journal of Ethnopharmacol*. 151: 478–484.
- Kubo, E., Yoshikawa, N., Kunitomo, M., Kagota, S., Shinozuka, K., Nakamura, K. 2010. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on experimental hepatic metastasis of melanoma by suppressing tumor cell invasion. *Anticancer Research*. 30: 3429-3433.
- Kumar, H., Spandana, M. 2013. Simultaneous Extraction, determination and analysis of Adenosine, Cordycepin and other derivatives of *Cordyceps sinensis* of Nepal by new validated HPLC method. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2(4): 43-45.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., Cao, Y. 2010. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories Impact Factor* 9: 85.
- Li, J., Guan, M., Li, Y. 2015. Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*. *Procedia Engineering*. 102 :485 – 491.

- Lin, W.H., Tsai, M.T., Chen Y.S., Lai M.N., Jeng K.C.G. 2007. Improvement of sperm production in subfertile boars by *Cordyceps militaris* supplement. The American Journal of Chinese Medicine. 35(4): 41-631.
- Ling, J.Y., Zhang, G.Y., Lin, J.Q., Cui, Z.J., Zhang, C.K. 2009. Supercritical fluid extraction of cordycepin and adenosine from *Cordyceps kyushuensis* and purification by high-speed counter-current chromatography. Separation and Purification Technology. 66: 625-629.
- Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S., Zhong, J.J. 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Process Biochemistry 40(5): 1667-1672.
- Mao, X.B., Zhong, J.J. 2004. Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors. Biotechnology Progress. 20: 1408-1413.
- Mao, X.B., Zhong, J.J. 2006. Significant effect of NH_4^+ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology. 38: 343-350.
- Mandal Ananya. 2014. What is Adenosine. [online].Available:<http://www.news-medical.net/health/What-is-Adenosine.aspx>(สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- Mcintosh james. 2015. Eggs:heath Benefits,Nutrition information Risk. [online].available:<http://www.medicalnewstoday.com/articles/283659.php> (สืบค้นวันที่ 15 มิถุนายน 2559)
- Nakamura, K., Shinozuka, K., Yoshikawa, N. 2015. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. Journal of Pharmacological Sciences. 127: 53-56.
- Park, J.P., Kim, S.W., Wang, H.J., Cho, Y.J., Yun, J.W. 2002. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology. 31: 250-255.
- Park, S.E, Yoo H.S., Jin C.Y., Hong S.H., Lee Y.W., Kim B.W., Lee S.H., Kim W.J., Cho C.K., Choi Y.H . 2009. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*. Food and Chemical Toxicology. 47: 1667-1675.
- Rao Y.K., Fang S.H., Wu W.S., Tzeng Y.M. 2010. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. Journal of Ethnopharmacol. 131: 363-367.

- Seth, R., Haider, S.Z. and Mohan, M. 2104. Pharmacology phytochemistry and traditional uses of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc: A recent update for future prospects. Indian Journal of Traditional Knowledge. 13(3) : 551-556.
- Shih, I., Tsai K.L., Hsieh, C. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochem Engineering Journal. 33(3): 193–201.
- Taylor Kelly. 2015. What Are the Benefits of Milk Powder.[online].available :<http://www.livestrong.com/article/316903-what-are-the-benefits-of-milk-powder/> (สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- Tuli, H.S., Sharma, A.K., Sandhu, S.S., Kashyap, D .2013. Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential. Life Sciences 93:863–869.
- Tuli, H.S., Sharma, A.K., Sandhu, S.S., Kashyap, D .2014. Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. Journal of Biological Science. 1: 35-47.
- USDA National Nutrient Database. 2559. Egg. [online]. Available :<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/118?fgcd=&man=&facet=&count=&max=35&sort=&qlookup=egg+whole+boiled&offset=&format=Full&new=&measureby=> (สืบค้นวันที่ 18 มิถุนายน 2559)
- USDA National Nutrient Database. 2559. Milk powder. [online]. Available :<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/191?fgcd=&man=&facet=&count=&max=35&sort=&qlookup=milk&offset=&format=Full&new=&measureby=> (สืบค้นวันที่ 17 มิถุนายน 2559)
- Wan, F., Guo, Y. and Deng, X. 1998. Sex hormone-like effects of JinShuiBao [CS-4] capsule: pharmacological and clinical studies [in chinese]. Chinese Traditional Patented Medicine. 9: 29-31.
- Wang, H.J., Pan M.C., Chang C.K., Chang, S.W., Hsieh, C.W. 2014. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Cordycepin from *Cordyceps militaris* Using Orthogonal Experimental Design. Molecules. 19: 20808-20820.
- Wen, T.C., Li, G.R., Kang, J.H., Kang, C., Kevin, D.H. 2014. Optimization of solid-state Fermentation of fruiting body growth and cordycepin production by *cordyceps militaris*. Chiang Mai Journal of Science. 41(4): 858-872.
- Won S. Y, Park E. H. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruitingbodies of *Cordyceps militaris*. Journal of Ethnopharmacol. 96: 555–61.

- Xie, C.Y., Gu, Z.X., Fan, G.J., Gu, F.R., Han, Y.B., Chen, Z.G. 2009. Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158: 483–492.
- Yi, Z.L., Huang, W.F., Ren, Yan., Onac, E., Zhou G.F., Peng, S., Wang, X.J, Li, H.H. 2014. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae*. 175: 139–143.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

สูตรอาหารแข็ง PDA (ดัดแปลงจากลุงหยุด)

วัสดุ	ปริมาณ
มันฝรั่ง	200 กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50 กรัม
เปปโตน	10 กรัม
ยีสต์สกัด	10 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
ผงวุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

หมายเหตุ น้ำตาลกลูโคสต้องใส่แยกจากส่วนผสมอื่น เมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมาผสมกับส่วนผสมอื่นเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

สูตรอาหาร PDB (ดัดแปลงจากลุงหยุด)

วัสดุ	ปริมาณ
มันฝรั่ง	200 กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50 กรัม
เปปโตน	10 กรัม
ยีสต์สกัด	10 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

หมายเหตุ น้ำตาลกลูโคสจำเป็นต้องนึ่งฆ่าเชื้อแยกกับส่วนผสมอื่นๆ เมื่ออาหารเย็นลงแล้วจึงนำกลูโคสมาผสมกับส่วนผสมอื่นๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า PDB+ (เพิ่มตัวหนอน 50 กรัมต่อลิตร) (ดัดแปลงจากลุงหยุด, 2556)

อาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าจะประกอบด้วย 2 ส่วน โดยจะทำการเตรียมส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 แยกออกจากกัน เมื่อเตรียมส่วนที่ 2 เสร็จเรียบร้อยแล้วจะนำส่วนที่ 2 ใส่ลงไปในส่วนที่ 1 ซึ่งมีข้าวชนิดต่างๆ บรรจุอยู่ในขวด

ส่วนที่ 1

วัสดุ	ปริมาณ
ข้าวชนิดต่างๆ	40 กรัมต่อขวด

ส่วนที่ 2

วัสดุ	ปริมาณ
มันฝรั่ง	200 กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50 กรัม
เปป्टอน	10 กรัม
ยีสต์สกัด	10 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20 กรัม
ตัวหนอน	50 กรัม
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. เตรียมมันฝรั่งโดนนำไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือกมันฝรั่งหั่นเป็นลูกเต๋ารูปร่าง 1 ลูกบาศก์ เซนติเมตร
2. เตรียมข้าวโพดอ่อนปอกเปลือกให้สะอาดหั่นเป็นชิ้นเล็กๆหนาประมาณ 1 เซนติเมตร
3. ต้มมันฝรั่ง (200 กรัม) พร้อมกับข้าวโพดอ่อน (50 กรัม) ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้จับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. นำส่วนผสมอื่น (น้ำตาลกลูโคส เปป्टอน ยีสต์สกัด) มาใส่รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน คนส่วนผสมให้เข้ากันดี
6. นำดักแต้ 50 กรัมมาปั่นรวมกับส่วนผสมทั้งหมด
7. นำมากรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบางแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
8. เตรียมข้าวชนิดต่างๆใส่ขวดแก้ว 40 กรัม แล้วนำส่วนผสมตามข้อ 7 ใส่ลงในขวดปริมาตร 60 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

ขั้นตอน	สภาพแวดล้อม	ข้อสังเกต	ระยะเวลา
1. เพาะเลี้ยงหัวเชื้อในอาหาร PDA	แสง:มืด อุณหภูมิ:18-22 องศาเซลเซียส	ลักษณะเส้นใยเป็นสีขาวแผ่ออกเป็นวงกลม	14-15 วัน
2. เพาะเลี้ยงหัวเชื้อเหลวในอาหาร PDB โดยตัดชิ้นวันจากอาหาร PDA มา 3 ชิ้น ชิ้นละ 1x1 เซนติเมตร	แสง:มืด อุณหภูมิ:25 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่า 100 รอบต่อนาที	ลักษณะเส้นใยเป็นก้อนกระจายทั่วอาหาร PDB	2 วัน
3. เพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง(ข้าวไรสเบอร์รี่และแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน	แสง:มืด อุณหภูมิ:20-22 องศา	ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวกระจายทั่วอาหารแข็ง	14 วัน
4. การกระตุ้นโดยใช้แสง	แสง:ไฟแอลอีดี 200 ลักซ์ อุณหภูมิ:20-22 องศา	เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีส้มและบางส่วนเป็นสีขาว	14 วัน

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณ

วิธีการคำนวณน้ำหนักแห้ง

1. ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าที่อบแล้วบันทึกค่า
 2. เก็บตัวอย่างและชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักหลอดเปล่าและน้ำหนักเซลล์)
- นำไปอบแห้งบันทึกค่า

3. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการนี้

$$\text{น้ำหนักแห้ง} = \text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์แห้งหลังอบ} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่าหลังอบ}$$

วิธีการคำนวณร้อยละความชื้น

1. ชั่งกระดาษฟรอยด์เปล่าหลังอบบันทึกค่า
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนนำไปอบแห้งบันทึกค่าและนำไปอบแห้ง
3. ชั่งน้ำหนักฟรอยด์พร้อมตัวอย่างหลังอบแห้ง
4. นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 แสดงค่าความชื้นและค่าพีเอชของกากถั่วเหลือง ไข่ไก่ นมผง และชุดควบคุม (เปปโตเนและยีสต์สกัด) ที่ปริมาตร 60 65 และ 70 มิลลิลิตร

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณน้ำ (มล.)	ร้อยละความชื้นเฉลี่ย	pH
กากถั่วเหลือง	60	61.93	5.66
กากถั่วเหลือง	65	63.65	5.7
กากถั่วเหลือง	70	60.76	5.66
นมผง	60	55.25	5.93
นมผง	65	56.73	5.96
นมผง	70	57.41	5.97
ไข่ไก่	60	61.54	6.23
ไข่ไก่	65	62.39	6.16
ไข่ไก่	70	62.61	6.16
ชุดควบคุม	60	57.01	5.78
ชุดควบคุม	65	59.72	5.89
ชุดควบคุม	70	63.6	5.92

วิธีการคำนวณปริมาณไนโตรเจนในไข่ กากถั่วเหลือง และนมผง

โดยใช้หลักการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในอาหารโดยวิธี Kjeldahl Method (Determination of Protein in Foods by Kjeldahl Method, 1800) จากการเทียบหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด จากหลักการที่ว่าโปรตีนจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 16

ในไข่ไก่ 100 กรัม จะมีปริมาณโปรตีนอยู่ 12.3 กรัม ดังนั้น
 ปริมาณโปรตีน 100 กรัมจะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16 กรัม
 ถ้าโปรตีน 12.3 กรัม จะมีไนโตรเจนอยู่ $\frac{12.3 \times 16}{100} = 1.97$ กรัม

ในกากถั่วเหลือง 100 กรัม จะมีปริมาณโปรตีน 32 กรัม ดังนั้น
 ปริมาณโปรตีน 100 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16 กรัม
 ปริมาณกากถั่วเหลือง 100 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ $\frac{32 \times 16}{100} = 5.12$ กรัม

ในนมผง 100 กรัม มีปริมาณโปรตีนอยู่ 15.625 กรัม ดังนั้น
 ปริมาณโปรตีน 100 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 16 กรัม
 ปริมาณนมผง 100 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ $\frac{15.625 \times 16}{100} = 2.5$ กรัม

ในเปปโตินและอีสต์สก็ดจะมีปริมาณไนโตรเจนดังนี้
 ตารางภาคผนวกที่ ค-2 แสดงปริมาณไนโตรเจนของอีสต์สก็ดและเปปโติน

	ปริมาณไนโตรเจน(กรัม/100กรัม)
เปปโติน	11.0
อีสต์สก็ด	19.6

จากตาราง ง-1 สามารถคำนวณการใช้ปริมาณไนโตรเจนได้ดังนี้
 ปริมาณเปปโติน 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 11กรัม
 ถ้าเปปโติน 10 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน $\frac{11 \times 10}{100} = 1.1$ กรัม

ปริมาณอีสต์สก็ด 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 19.6 กรัม
 ถ้าอีสต์สก็ด 10 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน $\frac{19.6 \times 10}{100} = 1.96$ กรัม

ดังนั้นในสูตรอาหารจะต้องใช้เปปโติน 10 กรัม และอีสต์สก็ด 10 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน $1.1 + 1.96 = 3.06$ กรัมไนโตรเจน

ใช้ไข่ไก่แทนร้อยละ 100

ในปริมาณอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ปริมาณไนโตรเจนจากเปปโตินและยีสต์สกัดปริมาณ 3.06 กรัม ไนโตรเจน

ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจน 1.97 กรัม ต้องใช้ไข่ไก่ 100 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 3.06 กรัม ต้องใช้ไข่ไก่ $\frac{3.06 \times 100}{1.97} = 155.49$ กรัม

ใช้กากถั่วเหลืองแทนร้อยละ 100

ในปริมาณอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ปริมาณไนโตรเจนจากเปปโตินและยีสต์สกัดปริมาณ 3.06 กรัม ไนโตรเจน

ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจน 5.12 กรัม ต้องใช้กากถั่วเหลือง 100 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 3.06 กรัม ต้องใช้กากถั่วเหลือง $\frac{3.06 \times 100}{5.12} = 59.8$ กรัม

ใช้นมผงแทนร้อยละ 100

ในปริมาณอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ปริมาณไนโตรเจนจากเปปโตินและยีสต์สกัดปริมาณ 3.06 กรัม ไนโตรเจน

ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจน 2.5 กรัม ต้องใช้นมผง 100 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 3.06 กรัม ต้องใช้นมผง $\frac{3.06 \times 100}{2.5} = 122.4$ กรัม

วิธีคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

การคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution) ถ้าต้องการสารมาตรฐานคอร์โดเซปินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถคำนวณได้ดังนี้
เตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานคอร์โดเซปินมา 0.002 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์สูง 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร

1 กรัม เท่ากับ 1000 มิลลิกรัม

0.001 กรัม เท่ากับ 1 มิลลิกรัม

1 มิลลิกรัม เท่ากับ 1000 ไมโครกรัม

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตรสามารถเตรียมได้โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$1000 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times V_1 = 100 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร} \times 2000 \text{ ไมโครลิตร}$

$V_1 = 200 \text{ ไมโครลิตร}$

ดังนั้นถ้าต้องการ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 200 ไมโครลิตรและเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1800 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตรสามารถเตรียมได้โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times V_1 = 80$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times 2000$ ไมโครลิตร

$$V_1 = 160 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการ ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 160 ไมโครลิตรและเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1840 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตรสามารถเตรียมได้โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times V_1 = 60$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times 2000$ ไมโครลิตร

$$V_1 = 120 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการ ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 120 ไมโครลิตรและเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1880 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตรสามารถเตรียมได้โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times V_1 = 40$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times 2000$ ไมโครลิตร

$$V_1 = 80 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการ ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 80 ไมโครลิตรและเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1920 ไมโครลิตร

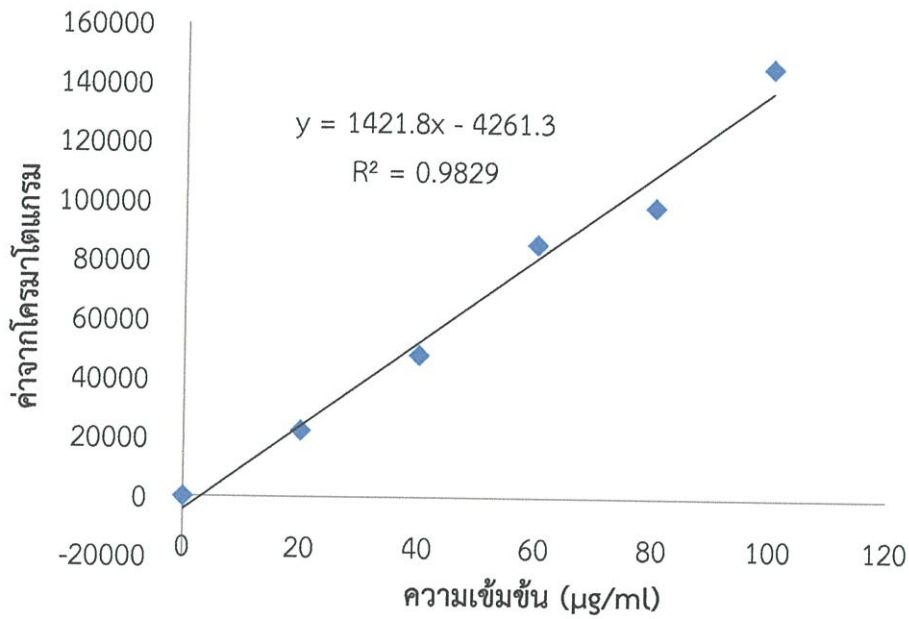
ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตรสามารถเตรียมได้โดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times V_1 = 20$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\times 2000$ ไมโครลิตร

$$V_1 = 40 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปิน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 40 ไมโครลิตรและเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1920 ไมโครลิตร

การคำนวณสารละลายมาตรฐานอะดีโนซินใช้วิธีคำนวณเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
วิธีคำนวณกราฟมาตรฐานคอร์โดเซปินจากกราฟมาตรฐาน



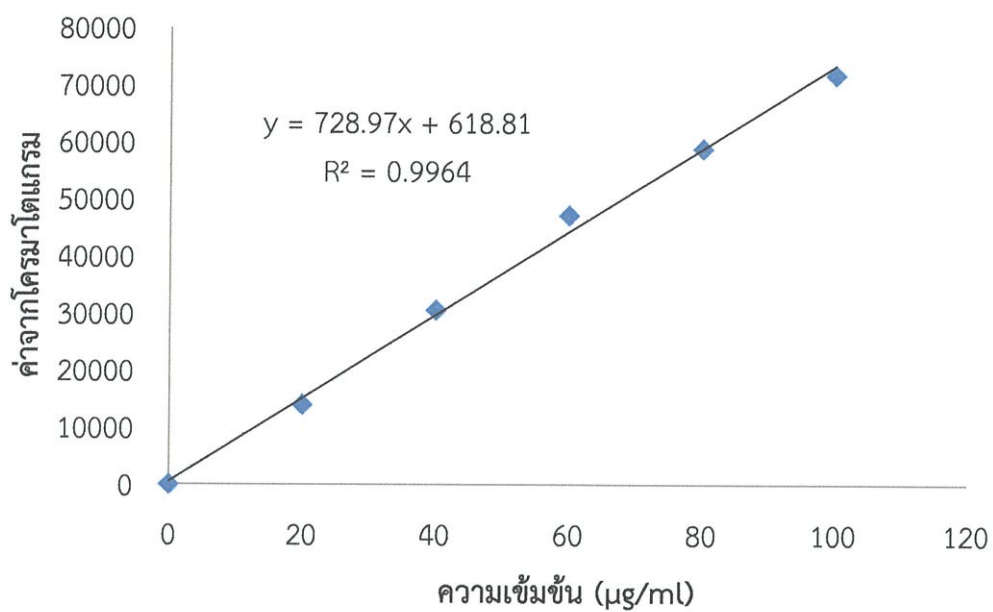
รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานคอร์โดเซปิน

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาสารคอร์โดเซปินโดยใช้สมการ ดังนี้

$$X = \frac{Y+4261.3}{1421.8}$$

โดย Y = ค่าจากโครมาโตแกรม

X= ความเข้มข้นของคอร์โดเซปิน



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานอะดีโนซีน

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาสารคอร์โคเตป็นโดยใช้สมการ ดังนี้

$$X = \frac{Y - 618.81}{728.97}$$

โดย Y = ค่าจากโครมาโตแกรม

X = ความเข้มข้นของอะดีโนซีน

ภาคผนวก ง

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยน้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อใช้ในการคัดเลือกหัวเชื้อในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ชั่วโมงที่ 24-168

Duncan^a

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
24	3	.60000		
48	3	2.00000		
72	3		7.70000	
120	3		12.06667	12.06667 ^b
96	3			12.76667
168	3			14.66667
144	3			15.40000
Sig.		.505	.051	.154

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งในการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ชั่วโมงที่ 24-168

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	651.666	6	108.611	17.307	.000
Within Groups	87.860	14	6.276		
Total	739.526	20			

ตารางภาคผนวกที่ ง-3 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการสกัดสารคอร์โคโรไดเซปิน จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไซโก้ นมผง กากถั่วเหลือง และชุดควบคุม(เปปโตินและอีสต์ สกัด)

แหล่งไนโตรเจน	extraction	Mean	Std. Deviation	N
ชุดควบคุม	ultrasonic	54.37333	8.206365	3
	waterbath	34.72667	11.669234	3
	Total	44.55000	14.042921	6
ไซโก้	ultrasonic	30.96333	2.734636	3
	waterbath	67.16333	23.626668	3
	Total	49.06333	24.887970	6
นมผง	ultrasonic	26.14000	3.871524	3
	waterbath	43.48667	13.023288	3
	Total	34.81333	12.810540	6
กากถั่วเหลือง	ultrasonic	13.61667	2.410277	3
	waterbath	15.05333	5.520075	3
	Total	14.33500	3.889919	6
Total	ultrasonic	31.27333	15.973520	12
	waterbath	40.10750	23.334017	12
	Total	35.69042	20.069642	24

ตารางภาคผนวกที่ ง-4 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาอิทธิพลร่วมของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจน และวิธีการสกัดสารด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงที่มีผลต่อปริมาณสารคอร์โคเซปิน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7284.005 ^a	7	1040.572	8.408	.000
Intercept	30571.340	1	30571.340	247.019	.000
แหล่งไนโตรเจน	4284.901	3	1428.300	11.541	.000
extraction	468.255	1	468.255	3.784	.070
แหล่งไนโตรเจน *	2530.849	3	843.616	6.816	.004
extraction					
Error	1980.177	16	123.761		
Total	39835.522	24			
Corrected Total	9264.182	23			

a. R Squared = .786 (Adjusted R Squared = .693)

ตารางภาคผนวกที่ ง-5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยของสารคอร์โคเซปินที่ได้จากการทดลอง ที่มีปัจจัยมี 2 ปัจจัยได้แก่ แหล่งไนโตรเจน 4 ระดับ และวิธีการสกัด 2 ระดับ

Duncan^a

treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
กากถั่วเหลือง	3	13.61667			
ultrasonicate					
กากถั่วเหลือง waterbath	3	15.05333			
นมผง ultrasonicate	3	26.14000	26.14000		
ไข่ไก่ ultrasonicate	3	30.96333	30.96333		
control waterbath	3	34.72667	34.72667	34.72667	
นมผง waterbath	3		43.48667	43.48667	
control ultrasonicate	3			54.37333	54.37333
ไข่ไก่ waterbath	3				67.16333
Sig.		.051	.097	.056	.178

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางภาคผนวกที่ ง-6 การวิเคราะห์ทางสถิติของความแปรปรวนของสารคอร์ไดเซปินที่ใช้ในการทดลองจากการทดลองที่มีปัจจัยมี 2 ปัจจัยได้แก่ แหล่งไนโตรเจน 4 ระดับ และวิธีการสกัด 2 ระดับ

ANOVA

cordycepin

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7284.005	7	1040.572	8.408	.000
Within Groups	1980.177	16	123.761		
Total	9264.182	23			

ตารางภาคผนวกที่ ง-7 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาอิทธิพลร่วมของการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนและวิธีการสกัดสารด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงที่มีผลต่อปริมาณสารอะดีโนซีน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41697.288 ^a	7	5956.755	7.856	.000
Intercept	310300.945	1	310300.945	409.214	.000
แหล่งไนโตรเจน	30765.437	3	10255.146	13.524	.000
extraction	8188.120	1	8188.120	10.798	.005
แหล่งไนโตรเจน * extraction	2743.731	3	914.577	1.206	.339
Error	12132.557	16	758.285		
Total	364130.790	24			
Corrected Total	53829.845	23			

a. R Squared = .775 (Adjusted R Squared = .676)

ตารางภาคผนวกที่ ง-8 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเฉลี่ยปริมาณสารอะดีโนซีนที่ได้จากการ
เพาะเลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจน 4 แหล่ง

Duncan^{a,b}

แหล่งไนโตรเจน	N	Subset	
		1	2
กากถั่วเหลือง	6	52.04500 ^a	
ไข่ไก่	6		129.83167 ^b
ชุดควบคุม	6		132.69333 ^b
นมผง	6		140.25667 ^b
Sig.		1.000	.544

ตารางภาคผนวกที่ ง-9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการสกัดสารอะดีโนซีนจาก
แหล่งไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด

แหล่งไนโตรเจน	extraction	Mean	Std. Deviation	N
ชุดควบคุม	ultrasonic	104.68667	22.492813	3
	waterbath	160.70000	32.978931	3
	Total	132.69333	39.732388	6
ไข่ไก่	ultrasonic	107.15333	8.598781	3
	waterbath	152.51000	23.070769	3
	Total	129.83167	29.319753	6
นมผง	ultrasonic	117.38333	9.244589	3
	waterbath	163.13000	25.868179	3
	Total	140.25667	30.490610	6
กากถั่วเหลือง	ultrasonic	51.72000	44.795406	3
	waterbath	52.37000	33.245885	3
	Total	52.04500	35.283051	6
Total	ultrasonic	95.23583	34.628373	12
	waterbath	132.17750	54.315038	12
	Total	113.70667	48.377970	24

ตารางภาคผนวกที่ ง-10 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของวิธีการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงทั้ง 2 วิธี

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 waterbath	132.17750	12	54.315038	15.679401
ultrasonic	95.2358	12	34.62837	9.99635

ตารางภาคผนวกที่ ง-11 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแปรปรวนของวิธีการสกัดด้วยน้ำบริสุทธิ์สูงทั้ง 2 วิธี โดยวิธีทางสถิติ T-test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 waterbath - ultrasonic	36.941667	26.108462	7.536864	20.353141	53.530192	4.901	11	.000