

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอาหารหมักร่วมกับวัสดุฐานถั่งเช่าสีทอง

THE INVESTIGATION OF THE FACTORS INVOLVED IN FERMENTED FOOD PRODUCTION
IN COMBINATION WITH CORDYCEP MILITARIS SUBSTRATEปวีณา สุขสาต^{*1} สามารถ ต่ายขาว¹ กัญญา กอแก้ว¹ ดวงหทัย รัตนสังธรรม¹ พรพรรณ รัตนสังจะ¹
เกรียงศักดิ์ ศรีวิจิตรกมล¹ และประนอม สุขเกื้อ¹Paweena Suksaard^{*1}, Samart Taikhao², Kanya Kokaew¹, Dounghatai Rattanasatchatham¹
Pornpan Ruttanasutja¹, Kriengsak Sriwichitkamol¹ and Pranom Sookkua¹^{*1} สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์หันตรา² สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ศูนย์นันทบุรี^{*1} Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of
Technology Suvarnabhumi, Huntra campus.² Department of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of
Technology Suvarnabhumi, Nonthaburi campus.

* paweena.s@rmutsb.ac.th

บทคัดย่อ

วัสดุฐานถั่งเช่าสีทองที่เหลือหลังการเก็บเกี่ยวมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่าในส่วนของการตก แต่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่สามารถแปรรูปเป็นอาหารที่หลากหลายได้ งานวิจัยนี้จึงศึกษาลักษณะของวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองและผลของสารสกัดต่อการเจริญของจุลินทรีย์อาหารหมัก เพื่อหาแนวทางประยุกต์ใช้ร่วมกับอาหาร พบว่าลักษณะทางกายภาพของวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองแบบสดมีสีส้มเหลืองและมีกลิ่นอับคล้ายกับวัสดุเพาะเห็ดทั่วไป มีความชื้น 55.7 ± 2.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออบแห้งจะมีสีเข้มและมีกลิ่นหอมมากขึ้น สัดส่วนของน้ำหนักลดลงจากวัสดุเพาะแบบสด 2.2 ± 0.1 เท่า มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เยื่อใย ถั่ว แคโรทีน และฟอสฟอรัส เท่ากับ 85.33 ± 0.37 , 8.89 ± 0.22 , 0.51 ± 0.12 , 2.19 ± 0.11 , 0.45 ± 0.03 , 0.05 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีสารคอโรโดเซปินและอะดีโนซีนเท่ากับ 420 และ 119 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ เมื่อสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอทานอลจะได้ปริมาณสารสำคัญมากกว่าสกัดด้วยน้ำถึง 50 เปอร์เซ็นต์ จากลักษณะเหล่านี้ การแปรรูปวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองจึงเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่มีวัตถุดิบหลักเป็นธัญพืช และมีแอลกอฮอล์ โดยที่สีส้มเหลืองของวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองไม่กระทบต่อลักษณะของอาหาร จึงเลือกคัดแยก จุลินทรีย์จากหัวเชื้อสาโท ข้าวหมาก คีเฟอร์ และเทมเป้ โดยคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ ยีสต์ รา และ แบคทีเรีย เมื่อทดสอบผลของสารสกัดวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองต่อการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ พบว่าสารสกัดความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราส่วนใหญ่ แต่ยับยั้งการเจริญ

วันที่รับบทความ 30 พฤศจิกายน 2566

วันแก้ไขบทความ 26 ธันวาคม 2566

วันตอบรับบทความ 29 ธันวาคม 2566

บางส่วนของเราในหัวเชื้อเทมเป้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียที่ทุกความเข้มข้นของสารสกัด
ดังนั้นในการแปรรูปวัตถุดิบถั่วเหลืองจึงเหมาะสมกับอาหารหมักที่ใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราเป็นหลัก

คำสำคัญ: คอร์ดิเซปิน, จุลินทรีย์, วัตถุดิบถั่วเหลือง, อะดีโนซีน, อาหารหมัก

ABSTRACT

The *Cordyceps militaris* substrate had fewer bioactive compounds than the stroma but contained carbohydrates, proteins, fats, and minerals that could be processed into a variety of food products. This research is about the characteristics study of *C. militaris* substrate and the effect of its extract on fermented food microbial growth for finding a solution to apply the *C. militaris* substrate to fermented food. It was found that the physical characteristics of fresh substrate colour were orange-yellow and had a musty smell like ordinary mushroom substrates with $55.7 \pm 2.2\%$ moisture content. The dry substrate was reduced in weight ratio from the fresh substrate to 2.2 ± 0.1 times. The substrate contains carbohydrate, protein, fat, fibre, ash, calcium, and phosphorus at $85.33 \pm 0.37\%$, $8.89 \pm 0.22\%$, $0.51 \pm 0.12\%$, $2.19 \pm 0.11\%$, $0.45 \pm 0.03\%$, $0.05 \pm 0.01\%$, and $0.08 \pm 0.00\%$, respectively. Cordycepin and adenosine were found in the substrate at 420, and 119 mg/100 g, respectively. The main bioactive agent content in the substrate extracted with ethanol was higher than that extracted with water by 50%. These characteristic results showed that the *C. militaris* substrate is suitable for formulation with food composed of grains and alcohol, and the orange-yellow colour of the substrate does not affect its appearance. Therefore, microorganisms were isolated from rice wort, Khao Mak, kefir, and tempeh. Three groups of microorganisms, like yeast, mould, and bacteria, were isolated. It was found that the extracts at concentrations of 2.5, 5, and 10% had no effect on growth of most yeast and mould, but partially inhibited the growth of mould in the tempeh inoculum at a 10% concentration and inhibited bacterial groups at all test concentrations of the extract. So, *C. militaris* substrates are suitable for fermented foods that use yeast and mould as key microorganisms.

Keywords: Cordycepin, microorganisms, *Cordyceps militaris* substrate, adenosine, fermented foods

1. บทนำ

ปัจจุบันการผลิตถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยจำลองสภาวะเลียนแบบธรรมชาติ ถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก ได้แก่ คอร์ดิเซปิน (cordycepin) และอะดีโนซีน (adenosine) ซึ่งมีปริมาณมากในส่วนช่อดอก (stroma) [1] เกษตรกรผู้ผลิตจึงใช้ส่วนของดอกแปรรูปและจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีราคาสูง แต่เหลือส่วนของฐานวัสดุเพาะพร้อมเส้นใย ซึ่งยังมีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักเหลืออยู่แต่น้อยกว่าส่วนของดอก วัสดุฐานถั่งเช่าสีทองประกอบด้วย ข้าวหรือธัญพืช น้ำตาล กลูโคส น้ำตาลซูโครส เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ หนอนดักแด้ มันฝรั่ง แร่ธาตุและวิตามิน สามารถนำไปแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่าและความหลากหลายของอาหารได้ด้วยจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ เช่น ราและยีสต์ สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ข้าวหมาก สาโท เป็นต้น ราและแบคทีเรียสามารถใช้โปรตีน ไขมัน เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนและสารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค เช่น ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เทมเป้ เป็นต้น แต่เนื่องจากการศึกษาว่าสารคอร์ดิเซปินในถั่งเช่าสีทองสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งอาจมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหารหมักและลักษณะต่าง ๆ ของอาหารได้ [2] จึงจำเป็นต้องศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุฐานถั่งเช่าสีทองร่วมกับจุลินทรีย์ในอาหารหมัก งานวิจัยนี้จึงศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมักร่วมกับวัสดุฐานถั่งเช่าสีทอง ทั้งลักษณะของวัสดุฐานถั่งเช่าสีทอง องค์ประกอบ และผลของสารสกัดต่อการเจริญของจุลินทรีย์อาหารหมัก เพื่อหาแนวทางประยุกต์ใช้วัสดุฐานถั่งเช่าสีทองร่วมกับอาหารที่หลากหลายมากขึ้น และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมักอีกทางหนึ่ง

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นจุลินทรีย์ประเภทฟังไจที่เป็นปรสิตของแมลง พบในประเทศแถบทวีปเอเชีย มีสารที่สำคัญ ได้แก่ คอร์ดิเซปิน (cordycepin) อะดีโนซีน (adenosine) กรดคอร์ดิเซปิก (cordycepic acid) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และแร่ธาตุอื่น ๆ [3] โดยสารคอร์ดิเซปินและอะดีโนซีนเป็นสารหลักที่บ่งชี้คุณภาพของถั่งเช่า สารสำคัญเหล่านี้มีผลต้านสารอนุมูลอิสระ เพิ่มภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต บำรุงประสาท ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ควบคุมระดับคอเลสเตอรอลและฮอร์โมน เป็นต้น [4-5] ปัจจุบันถั่งเช่าสีทองสามารถเพาะเลี้ยงได้ในสภาวะจำลอง โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ลูกเดือย และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน เนื้อสัตว์ ไข่ หนอนไหม มันฝรั่งสด นมผง เป็นวัสดุเพาะ [6] ซึ่งหลังจากเก็บเกี่ยวส่วนดอกไปแล้ว วัสดุฐานถั่งเช่าสีทองมีสารคอร์ดิเซปินเหลืออยู่ในระดับที่น้อยกว่าในดอก แต่ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ เช่น ใช้เป็นสารเสริมในอาหารเลี้ยงสัตว์ พบว่ามีผลต่อการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่ดีในทางเดินอาหาร และมีผลในการลดปริมาณเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย [7-8] การเสริมอาหารด้วยวัสดุฐานถั่งเช่าสีทองจึงเป็นการเสริมสารส่งเสริมชีวิต (prebiotic) ร่วมกับส่งเสริมจุลินทรีย์เสริมชีวิต (probiotic) ทำให้เกิดระบบที่ส่งเสริมร่วมกัน (symbiotic) ส่งผลดีต่อระบบทางเดินอาหาร

แบคทีเรียที่สำคัญในอาหารหมักส่วนใหญ่มี 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกและแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก โดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติก และทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว เช่น ในแหนม กิมจิ กะหล่ำเปรี้ยว โยเกิร์ต และเนยแข็ง เป็นต้น ขณะที่แบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกสามารถออกซิโดซ์เอทิลแอลกอฮอล์ให้กลายเป็นกรดอะซิติก เช่น น้ำส้มสายชู และวุ้นมะพร้าว เป็นต้น [9-10] ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น ข้าวหมาก สาเก อุ สาโท ส่วนใหญ่มียีสต์และราเป็นหลัก โดยยีสต์และราย่อยแบ่งให้เป็น

น้ำตาลและใช้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงสามารถใช้และยีสต์ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีข้าวเป็นวัตถุดิบหลัก และเนื่องจากวัสดุฐานเพาะเลี้ยงถึงเข้าประกอบด้วยธัญพืชที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ และยังมีสารคอร์ไดซิปีน หากนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจะสามารถดึงสารที่มีประโยชน์จากวัสดุฐานถึงเข้าสีทองออกมาได้ดียิ่งขึ้น และจุลินทรีย์เหล่านี้จะผลิตสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะสารเสริมชีวิตและสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปัจจุบันสารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้ในการส่งเสริมและป้องกันโรคต่าง ๆ ทั้งในรูปของอาหารและสมุนไพรอีกด้วย

3. วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง

วัสดุเพาะถึงเข้าสีทองประกอบด้วยเมล็ดข้าว ดอกแด่ใหม่ และอาหารเสริมอื่น ๆ เช่น กลูโคส ซูโครส เปปโตน ยีสต์สกัด แมกนีเซียมซัลเฟต วิตามินบี1 และมันฝรั่ง เพาะเลี้ยงถึงเข้าสีทองเป็นเวลา 90 วัน แยกส่วนดอกและวัสดุฐานถึงเข้าสีทองออกจากกันในห้องปลอดเชื้อ ตัดแบ่งวัสดุฐานถึงเข้าสีทองเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์นิ้ว นำมาหาความชื้นโดยเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนและหลังอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงและชั่งน้ำหนัก เก็บวัสดุฐานถึงเข้าสีทองที่แห้งแล้วในภาชนะปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการหลักและปริมาณสารสำคัญของวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง

นำวัสดุฐานถึงเข้าสีทองที่แห้งแล้วมาบดละเอียดและนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการเริ่มต้น ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า และปริมาณกากหยาบ [11] โดยห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์และตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบังวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดซิปีนและอะดีโนซีนด้วย High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) โดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อวิเคราะห์ความเหมาะสมของวัสดุฐานถึงเข้าสีทองในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อไป

3. การเตรียมสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง

นำวัสดุฐานถึงเข้าสีทองที่แห้งแล้วมาบดละเอียด สกัดสารจากวัสดุฐานถึงเข้าสีทองโดยใช้ตัวทำละลาย คือ เอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ดัดแปลงวิธีการสกัดจากจิราภรณ์และเรือนแก้ว (2555) [12] โดยนำวัสดุฐานถึงเข้าสีทองบดละเอียดมาแช่ในเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราส่วนวัสดุฐานต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทั้งหมด 3 รอบ แล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ระเหยสารสกัดให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง 100 กรัม เก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเข้าสีทองแบบแผ่นแห้ง

นำสารสกัดตั้งต้นมาเจือจางโดยละลายในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นกรองปลอดเชื้อ วางลงในจานปลอดเชื้อ หยดสารละลายของสารสกัด 20 ไมโครลิตรตรงกลางแผ่น ใช้ตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และหยดยาปฏิชีวนะ

tetracycline ปริมาณ 20 ไมโครกรัม ในอีกแผ่น จัดเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารหมักต่อไป

5. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สำคัญในหัวเชื้ออาหารหมัก

นำตัวอย่างหัวเชื้ออาหารหมัก ได้แก่ คีเฟอร์ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสาโท และหัวเชื้อเหมเบ้ มาคัดแยกจุลินทรีย์โดยวิธี dilution plate count คัดแยกแบคทีเรียบนอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) คัดแยกยีสต์และราบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำจานอาหารมาคัดแยกจุลินทรีย์ โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันไปเขียนลงบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่โดยวิธี Cross Streak บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเกิดโคโลนีเดี่ยว เลือกโคโลนีเดี่ยวมาตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งเอียงที่เหมาะสม และผสมกับสารละลายกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาในระยะยาว

6. การศึกษาผลของสารสกัดจากวัตถุดิบเข้าสู่ห้องต่อการเจริญของจุลินทรีย์หัวเชื้ออาหารหมัก

6.1 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Disc diffusion method

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากหัวเชื้อคีเฟอร์นำมาเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) และยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งสาโท นำมาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ก้านพันสำลีปลอดเชื้อจุ่มสารละลายเชื้อ และเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็งชนิดเดียวกับที่ใช้เลี้ยงเชื้อตอนต้น รอให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้คีมคีบปลอดเชื้อ คีบแผ่นกระดาษที่มีสารสกัดวางลงบนอาหารเพาะเชื้อให้แนบกับผิวหน้า ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำต่อเชื้อทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง [13] บันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

6.2 ทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Poisoned food technique

นำเชื้อราในหัวเชื้อลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งสาโท และเหมเบ้ เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ตัดบริเวณขอบของโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำชิ้นวุ้นมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมสารสกัด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ด้านที่มีเชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร ทำ 3 ซ้ำต่อความเข้มข้นสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลขนาดของโคโลนีเชื้อราเมื่อบ่มเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน [14] หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญดังสมการที่ (1)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(A - B) / A] \times 100 \quad (1)$$

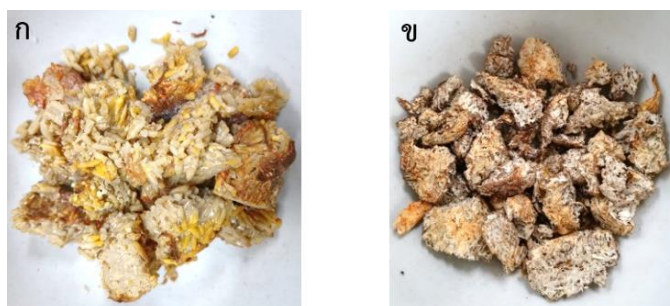
เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงราชุดควบคุม

B คือ ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงราผสมสารสกัด

4. ผลการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง

ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตถึงเข้าสีทองจะได้สัดส่วนของผลผลิตน้ำหนักสดในส่วนของดอกต่อวัสดุฐานเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ต่อ 1.5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ภายหลังการอบแห้งจะได้สัดส่วนของผลผลิตน้ำหนักแห้งในส่วนของดอกต่อวัสดุเพาะเลี้ยงประมาณ 1 ต่อ 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เนื่องจากความชื้นในส่วนของดอกมีมากกว่าส่วนของวัสดุเพาะเลี้ยงถึง 4 เท่า จึงทำให้มีปริมาณวัสดุเพาะถึงเข้าสีทองจำนวนมากภายหลังการเก็บเกี่ยว ลักษณะของวัสดุฐานเพาะเลี้ยงสดมีสีขาวปนเหลืองอ่อน มีกลิ่นของเห็ด เนื้อสัมผัสเชื่อมติดกันเป็นก้อน เนื่องจากถูกยึดกันไว้ด้วยเส้นใยของถึงเข้าสีทอง ตัดเป็นชิ้นเล็กได้ง่าย ภายหลังการอบแห้งลักษณะของวัสดุฐานเพาะเลี้ยงถึงเข้าสีทองมีสีส้มเข้มจนถึงน้ำตาล มีกลิ่นหอมขึ้นจากกลิ่นของข้าวอบ เนื่องจากข้าวเป็นวัตถุดิบหลักของวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง เนื้อสัมผัสแข็ง ขนาดของชิ้นเล็กลงประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของขนาดก่อนอบแห้ง และน้ำหนักลดลงประมาณ 1 เท่า (มีค่าปริมาณความชื้น 55.7 ± 2.1 เปอร์เซ็นต์) จากผลการเตรียมตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าการอบแห้งมีผลทำให้ลักษณะของวัสดุฐานถึงเข้าสีทองมีสีเข้มและกลิ่นที่ดีเด่นชัดมากยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะสด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะของวัสดุฐานถึงเข้าสีทองก่อนอบแห้ง (ก) และหลังการอบแห้ง (ข)

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเยื่อใย ปริมาณเถ้า ปริมาณแคลเซียม และปริมาณฟอสฟอรัสเท่ากับ 85.33 ± 0.37 , 8.89 ± 0.22 , 0.51 ± 0.12 , 2.19 ± 0.11 , 0.45 ± 0.03 , 0.05 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) มีสารออกฤทธิ์หลัก ได้แก่ คอร์โดเซปิน และอะดีโนซีน 420 และ 119 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง ตามลำดับ องค์ประกอบทางโภชนาการส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต จึงเหมาะที่จะใช้ผสมกับอาหารที่มีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตหรือธัญพืช เพื่อให้กลิ่นและรสชาติของอาหารนั้นไม่แตกต่างกันไป และยังมีปริมาณสารออกฤทธิ์หลักอยู่สูงพอที่จะใช้ผสมในอาหารได้ ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้ในอาหารหรือเครื่องดื่ม 100 กรัมจะมีสารสำคัญคอร์โดเซปินไม่เกิน 30 มิลลิกรัม และสารอะดีโนซีนไม่เกิน 170 มิลลิกรัม [15] ดังนั้น การผสมวัสดุฐานถึงเข้าสีทองในอาหารหรือเครื่องดื่มจึงผสมได้ไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบทางโภชนาการหลักในวัสดุฐานถึงเข้าสีทอง (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์)

ชนิดตัวอย่าง	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เยื่อใย	เถ้า	แคลเซียม	ฟอสฟอรัส
ฐานถึงเข้าสีทอง	85.33 ± 0.37	8.89 ± 0.22	0.51 ± 0.12	2.19 ± 0.11	0.45 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.00

4. การเตรียมสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองแบบแผ่นแห้ง

หลังจากสกัดสารจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารสกัดหยาบสีส้มแกมเหลือง หลังการกรองและระเหยจะได้สารสกัดหยาบซึ่งมีสารคอร์โคเซบินประมาณ 42 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ดังนั้น เมื่อหยดลงแผ่นกระดาษปริมาตร 20 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ จะมีความเข้มข้นของสารคอร์โคเซบินสเท่ากับ 0, 0.01, 0.021, 0.042, 0.084 และ 0.21 มิลลิกรัมต่อแผ่นตามลำดับ โดยสารสกัดมีการกระจายในกระดาษสม่ำเสมอ ไม่มีตะกอน และแห้งสนิทก่อนนำมาใช้ทดสอบ

5. การคัดแยกจุลินทรีย์ที่สำคัญในหัวเชื้ออาหารหมัก

จากการแยกจุลินทรีย์ที่สำคัญในหัวเชื้ออาหารหมัก พบว่าในหัวเชื้อคีเฟอร์สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 2 ไอโซเลท ยีสต์จำนวน 1 ไอโซเลท ในหัวเชื้อลูกแป้งข้าวหมากคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 2 ไอโซเลท ราจำนวน 3 ไอโซเลท ในหัวเชื้อลูกแป้งสาโทคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 2 ไอโซเลท ราจำนวน 1 ไอโซเลท และในหัวเชื้อเหมเป้คัดแยกได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในกลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์ และรา จำนวน 2, 6, และ 4 ไอโซเลทตามลำดับ ลักษณะของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีรูปร่างเซลล์แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ เซลล์รูปร่างแท่ง ติดสี่แตรมบว และเซลล์รูปร่างท่อนสั้น ติดสี่แตรมลบ กลุ่มยีสต์ที่คัดแยกได้มีรูปร่างเซลล์แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ เซลล์รูปไข่ มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding ส่วนอีกกลุ่มเป็นยีสต์ที่สร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) และในกลุ่มของรามีลักษณะโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ สปอร์มีถุงหุ้มแบบ sporangiospore และสปอร์ผนังหนากลางเส้นใยแบบ chlamydospore

6. การศึกษาผลของสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองต่อการเจริญของจุลินทรีย์หัวเชื้ออาหารหมัก

6.1 ผลการทดสอบการยับยั้งยีสต์ด้วยวิธี Disc diffusion method

จากการทดสอบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากหัวเชื้ออาหารหมักต่าง ๆ สามารถเจริญได้ปกติในทุกความเข้มข้นของสารสกัดทดสอบ (ไม่เกิดโซนใสรอบแผ่นกระดาษที่มีสารสกัด) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ ดังนั้น เป็นไปได้ว่าการผสมวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองในอาหารหมักที่ใช้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์หลักสามารถผสมวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองได้ถึงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาหารหมักที่ใช้ยีสต์เป็นหลัก ได้แก่ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ขนมปัง เป็นต้น

6.2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Poisoned food technique

จากการทดสอบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดยับยั้งการเจริญของราที่คัดแยกได้จากหัวเชื้อลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 ไอโซเลท (MM1, MM2 และ MM3) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 10 ± 2.3 เปอร์เซ็นต์ถึง 15.8 ± 0.8 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของราที่คัดแยกได้จากหัวเชื้อเหมเป้ไอโซเลท MT1 ได้ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 41.4 ± 2.4 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบไม่มีผลยับยั้งการเจริญของราที่คัดแยกได้จากหัวเชื้อลูกแป้งสาโท ไอโซเลท MS1 (ตารางที่ 2) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญในสารสกัดจากวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองมีผลยับยั้งราในหัวเชื้อเหมเป้ได้ดี ยับยั้งราในหัวเชื้อลูกแป้งข้าวหมากได้เล็กน้อยที่ความเข้มข้นของสารสกัด 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของราในหัวเชื้อลูกแป้งสาโท ดังนั้น ในการผสมวัสดุฐานถึงเชื้อสืทองในอาหารหมักเหมเป้ และข้าวหมาก

ควรใช้ในสัดส่วนที่ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ แต่หากเป็นการผลิตสาโทสามารถผสมวัตถุดิบถึงเข้าสีทองได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารสกัดจากวัตถุดิบถึงเข้าสีทอง

ไอโซเลท	การยับยั้งการเจริญของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์)		
	2.5	5	10
MM1	-	-	12.1 ± 4.4
MM2	-	-	15.8 ± 0.8
MM3	-	-	10.0 ± 2.3
MS1	-	-	-
MT1	-	-	41.4 ± 2.4

หมายเหตุ: MM = แยกจากลูกแบ่งข้าวหมาก, MS = แยกจากลูกแบ่งสาโท และ MT = แยกจากหัวเชื้อเทมเป้

- = สารสกัดไม่ยับยั้งการเจริญของรา

5. อภิปรายผลและข้อเสนอแนะการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีของวัตถุดิบถึงเข้าสีทองพบว่าวัตถุดิบถึงเข้าสีทองเมื่อนำไปอบแห้ง จะทำให้มีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนไปจากวัตถุดิบสด ได้แก่ มีเนื้อสัมผัสแข็งขึ้น บดละเอียดได้ง่าย มีสีเข้มขึ้น และมีกลิ่นที่ดีขึ้น องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบถึงเข้าสีทองประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า แคลเซียม และฟอสฟอรัส เท่ากับ 85.33 ± 0.37 , 8.89 ± 0.22 , 0.51 ± 0.12 , 2.19 ± 0.11 , 0.45 ± 0.03 , 0.05 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีส่วนประกอบของข้าวที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก มีสารออกฤทธิ์หลักที่สำคัญ ได้แก่ คอร์โคเซบิน และอะดีโนซีนปริมาณ 420 และ 119 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของวัตถุดิบถึงเข้าสีทอง ตามลำดับ เมื่อนำหัวเชื้อจุลินทรีย์อาหารหมักมาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่หลักในการทำอาหารหมัก ได้แก่ หัวเชื้อคีเฟอร์ ลูกแบ่งข้าวหมาก ลูกแบ่งสาโท หัวเชื้อเทมเป้ สามารถคัดแยกจากจุลินทรีย์หลักในหัวเชื้อคีเฟอร์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกได้จำนวน 2 ไอโซเลท ยีสต์จำนวน 1 ไอโซเลท ในหัวเชื้อลูกแบ่งข้าวหมากคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 2 ไอโซเลท ราจำนวน 3 ไอโซเลท ในหัวเชื้อลูกแบ่งสาโทคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 2 ไอโซเลท ราจำนวน 1 ไอโซเลท และในหัวเชื้อเทมเป้คัดแยกราได้จำนวน 1 ไอโซเลท รวมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในกลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ได้จำนวนทั้งสิ้น 2, 6, และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ จากนั้นได้ศึกษาผลของสารสกัดจากวัตถุดิบถึงเข้าสีทองต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากหัวเชื้ออาหารหมักชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดจากวัตถุดิบถึงเข้าสีทองยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียได้ทั้งหมด ซึ่งอาจส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียเป็นหลัก เช่น โยเกิร์ต มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหลวกว่าปกติได้ [16] แต่สารสกัดจากวัตถุดิบถึงเข้าสีทองไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์แม้จะใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มราเพียงเล็กน้อยเมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยธรรมชาติของถึงเข้าสีทองจะมีสารอะดีโนซีน และคอร์โคเซบิน ที่มีงานวิจัยยืนยันว่าสารหลักดังกล่าวสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ [4-5] จากผลของสารสกัดจากวัตถุดิบถึงเข้าสีทองต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากหัวเชื้ออาหารหมักชนิดต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบถึงเข้าสีทองสามารถใช้ผสมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ใช้หัวเชื้อลูกแบ่งข้าวหมาก ลูกแบ่งสาโท และหัวเชื้อเทมเป้ได้ โดยการผสมวัตถุดิบถึงเข้าสีทองในอาหารหมักเทมเป้ และข้าวหมาก ควรใช้ในสัดส่วนที่ไม่เกิน 5

เปอร์เซ็นต์ แต่หากเป็นการผลิตสาโทสามารถผสมวัสดุฐานถึงเข้าสีทองได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาผสมร่วมกับอาหารหมักที่มีหัวเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ สาโท ข้าวหมาก และเทมเป้ จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีโอกาสที่ดีในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักร่วมกับวัสดุฐานถึงเข้าสีทองต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัย จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ผ่านทุนงบบูรณาการวิจัยและนวัตกรรมปี 2563 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Cui, L., Dong, M. S., Chen, X. H., Jiang, M., Lv, X., and Yan, G. **A novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*, a Chinese traditional medicinal mushroom.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24, p.p. 483-489.
- [2] Nakthong, S. and Khammuangsa, P. **The use of water extraction from *Cordyceps militaris* waste medium in goat milk yogurt on sensory characteristics.** Journal of Agricultural Science and Management, 2018, 1(1), p.p. 13-21.
- [3] Bhandari, A.K., Negi, J.S., Bisht, V.K., Rana, C.S., Bharti, M.K. and Singh, N. **Chemical constituent, inorganic elements and properties of *Cordyceps sinensis* – a review.** Nature and Science of Sleep, 2010, 8, p.p. 253-256.
- [4] Dai, X.J., Liu, D.M. and Meng, X. **Anticancer effect research status of *Cordyceps sinensis*.** Journal of International Medical Research, 2000, 11, p.p. 376-378.
- [5] Ng, T.B. and Wang, H.X. **Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine.** Journal of Pharmaceutical, 2005, 57, p.p. 1509-1519.
- [6] Singpoonga, N., and Yosmethakun, R. **การพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทองด้วยกากน้ำตาล.** PSRU Journal of Science and Technology, 2022, 7(1), p.p. 14-29.
- [7] Ahn, Y.J., Park, S.J., Lee, S.G., Shin, S.C., and Choi, D.H. **Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48, p.p. 2744-2748.
- [8] Kim, G.B., Seo, Y.M., Kim, C.H., and Paik, I.K. **Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers.** Poultry Science, 2011, 90, p.p. 75-82.
- [9] Rhee, S.J., Lee, J.E., and Lee, C.H. **Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods.** Microbial Cell Factories, 2011, 10(1), p.p. 1-13.
- [10] De Roos, J., and De Vuyst, L. **Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages.** Current opinion in biotechnology, 2018, 49, p.p. 115-119.

- [11] AOAC Official Method. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 2005.
- [12] จิราภรณ์ บุราคร และ เรือนแก้ว ประพฤติ. **ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย**. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2555, 10, หน้า 11-22.
- [13] Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method**. The American Journal of Pathology, 1966, 49, p.p. 493-496.
- [14] Singh, J. and Tripathi, N.N. **Inhibition of storage fungi of blackgram (*Vigna mungo* L.) by some essential oils**. Flavour Fragrance Journal, 1999, 14, p.p. 1-4.
- [15] กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. **ข้อมูลบัญชีรายชื่อพืชที่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องดื่มในขณะบรรจุที่ปิดสนิท พ.ศ. 2552**. สืบค้นเมื่อ 24 มิถุนายน 2566. จาก <https://food.fda.moph.go.th/press-release/foodnews-18>
- [16] ศศิธร นาคทอง และ พัทธราพรรณ คำเมืองสา. **การใช้น้ำสกัดจากฐานเห็ดถั่งเช่าสีทองในโยเกิร์ตนมแพะต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส**. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ, 2018, 1(1), p.p. 13-21.