

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Cordyceps tenuipes* (Peck) เพื่อการผลิต เห็ดถั่งเช่าหิมะบนดักแด้ไหม

Strain Improvement of *Cordyceps tenuipes* (Peck) for Snowflake Cordyceps Production on Silkworm Pupae

ฐิติณิชา ไชยชนะ¹ จิราพร กุลสาริน^{1*} ปิยะวรรณ สุทธิประพันธ์¹ ไสว บุรณพานิชพันธุ์¹
และ ธัญญา ทะพิงค์แก²

Thitinicha Chaichana¹, Jiraporn Kulsarin^{1*}, Piyawan Suttiaprapan¹, Sawai Buranapanichpan¹
and Tanya Tapingkae²

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

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

²ภาควิชาเทคโนโลยีและพัฒนากาเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50300

²Department of Technology and Development in Agriculture, Faculty of Agricultural Technology,

Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai 50300, Thailand

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

(Received: 20 November 2018; Accepted: 23 January 2019)

Abstract: Snowflake cordyceps, *Cordyceps tenuipes* (Peck), is an entomopathogenic fungus which has been described as pharmaceutics due to its bioactive compounds in fruiting body or synnemata. Thus, the objective aimed to improve the fungal strain using ultraviolet radiation for high content of bioactive compounds such as adenosine. The result revealed that the characteristics and growth of the fungus have changed after exposing to ultraviolet C radiation of wavelength 254 nm from fluorescent lamps 30 watt (GHangqing T8, China). The colonies were white in color, thick mycelia and full grown on PDA. The colonies of QSDS1-1 isolate exposed to UVC for 0.5 and 5 minutes and QSDS1-2 isolate exposed to 0.5 and 10 minutes showed fully grown on PDA with white and thick mycelia. Then, these four selected colonies were tested for fruiting body production using a silkworm pupa as a substrate. It was obvious that the fungal isolate QSDS1-2 after exposing to UVC for 10 minutes yielded the rapid growth of yellow fruiting body with sharp at the end. There were white conidia on the terminal end of fruiting body which the average length was 2 cm. The fresh and dry weights of fruiting body were 1.10 and 0.50 g, respectively. The adenosine content from fruiting body of QSDS1-2 exposed UVC for 10 minutes was 50.11 mg/100 g.

Keywords: Snowflake cordyceps, silkworm pupae, strain improvement, UVC radiation, *Cordyceps tenuipes*

บทคัดย่อ: เห็ดถั่งเช่าหิมะ (snowflake cordyceps: *Cordyceps tenuipes* (Peck)) เชื้อราแมลงที่มีสารออกฤทธิ์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และเภสัชวิทยา โดยพบมากในก้านดอกเห็ดหรือก้านชูสปอร์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราชนิดนี้ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการฉายรังสี UVC ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 30 วัตต์ ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ผ่านการฉายรังสีมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม โดยมีโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คือ ไอโซเลท QSDS1-1 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที และไอโซเลท QSDS1-2 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที จากนั้นนำทั้ง 4 ไอโซเลทมาทำการศึกษาการสร้างก้านดอกเห็ดบนดักแด้ใหม่ พบว่า ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้อย่างรวดเร็ว มีลักษณะปลายแหลม สีเหลือง และบริเวณปลายก้านดอกเห็ดมีผงสีขาว (โคโคเดีย) เกาะติดอยู่ ขนาดของก้านดอกเห็ดมีความยาวเฉลี่ย 2 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.10 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ และพบปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 50.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

คำสำคัญ: เห็ดถั่งเช่าหิมะ ดักแด้ใหม่ ปรับปรุงพันธุ์ รังสี UVC *Cordyceps tenuipes*

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี (snowflake cordyceps) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps tenuipes* (Peck) ชื่อเดิมคือ *Paecilomyces tenuipes* และ *Isaria tenuipes* อยู่ในวงศ์ Cordycipitaceae (Kepler et al., 2017) เห็ดชนิดนี้เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงอันดับ Lepidoptera (Xu et al., 2006) ที่พบได้ทั่วไปบนพื้นที่สูงของประเทศเกาหลี ซึ่งมีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า Snowflake Dongchunghacho มีรายงานพบว่าเห็ดถั่งเช่าหิมะ *C. tenuipes* เป็นอาหารสุขภาพแบบดั้งเดิม และเป็นยาแผนโบราณในประเทศเกาหลี จีน และญี่ปุ่น (Xu and Yun, 2004) เห็ดถั่งเช่าหิมะนี้มีสารออกฤทธิ์สำคัญประเภทต่าง ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติในทางการแพทย์ และเภสัชวิทยาเป็นอย่างมาก โดยสารออกฤทธิ์นี้พบมากในก้านชูสปอร์ (synnemata) หรือก้านดอกเห็ด (fruiting body) เช่น polysaccharide (Lu et al., 2007) nucleotide (Xu et al., 2003) cordycepin, adenosine (Du et al., 2012) และ N6-(2-hydroxyethyl) adenosine ที่ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนเลือด เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน พื้นฟูระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายให้แข็งแรง (Chen et al., 2008) ปัจจุบันยังไม่พบการรายงานการพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราชนิดนี้ ซึ่งจากรายงานของ Ma et al. (2011) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยการชักนำการกลายพันธุ์เป็นหนึ่งในวิธีอันมี

ประสิทธิภาพที่นำมาใช้ในทางจุลชีววิทยา ซึ่งการฉายรังสี UV เป็นวิธีการหนึ่งในการชักนำการกลายพันธุ์ของเชื้อราได้ จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา *C. tenuipes* ด้วยการฉายรังสี UV เพื่อปรับปรุง และคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* ที่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ดีที่สุด ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการสร้างก้านดอกเห็ดที่สมบูรณ์แข็งแรงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้อาจช่วยเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญที่ได้จากก้านดอกเห็ด ซึ่งเป็นประโยชน์ทางเภสัชกรรม และเป็นการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ได้จากดักแด้ใหม่มาทำการเพาะเลี้ยงบน PDA โดยทำความสะอาดตู้ปลอดเชื้อด้วยเปิดแสงไฟ UV ไว้ 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตัดก้านดอกเห็ดที่ขึ้นบนตัวดักแด้ใหม่มาทำการเพาะเลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ผ่านการคัดเลือกโดยสังเกตลักษณะการเจริญของเส้นใย และลักษณะโคโลนี

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดทั้งหมดได้ 4 ไอโซเลท คือ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 จากนั้นนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 วัน เมื่อเชื้อ *C. tenuipes* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* โดยการฉายรังสี UVC

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* เจริญอยู่ที่ 4 ไอโซเลท ได้แก่ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ จากนั้นนำไปฉายรังสี UVC ด้วยหลอดหลอดฟลูออเรสเซนต์ 30 วัตต์ ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างกัน คือ 0.5, 1, 5, 10 นาที และไม่ฉายรังสี UVC โดยให้หลอด UVC ห่างจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 เซนติเมตร ทำการเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้แสงรังสี UVC สัมผัสกับโคโลนีโดยตรง ซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Radha *et al.* (2012) และ Brown (2010) โดยทดสอบเชื้อรา *C. tenuipes* 4 ไอโซเลท ในแต่ละไอโซเลท แบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี (5 ระยะเวลาการฉายรังสี) ทำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ และคัดเลือกจากลักษณะการเจริญเติบโตที่มีการพัฒนาที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

หลังการฉายรังสี UVC นำเชื้อไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ทำการสังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราทุก ๆ 3, 5, 7 และ 9 วัน โดยทำการบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *C. tenuipes* แต่ละไอโซเลทที่ได้รับรังสี UVC ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากนั้นทำการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *C. tenuipes* ที่มีการเจริญเติบโตดี และมีแนวโน้มเกิดการกลายพันธุ์

3. การทดสอบการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ของเชื้อรา *C. tenuipes* หลังการฉายรังสี UVC

3.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ถั่งเช่าหิมะ *C. tenuipes* ในอาหารเหลว (Sabouraud dextrose broth; SDB)

นำเชื้อรา *C. tenuipes* ที่คัดเลือกมาทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB ผสมดักแด้ใหม่ โดยนำเชื้อราที่ตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ใส่ลงในอาหารเหลว จำนวน 6 ชิ้นต่อขวด จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 20-24 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Luerdara *et al.* (2016) สังเกตลักษณะของอาหารเหลวในแต่ละกรรมวิธีเพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนดักแด้ใหม่

นำอาหารเหลวในข้อ 3.1 มาทดสอบการสร้างดอกเห็ดด้วยการฉีดเข้าตัวดักแด้ใหม่ โดยทำการล้างดักแด้ใหม่ด้วยน้ำเปล่า และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ประมาณ 1 นาที นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการฉีดเชื้อรา *C. tenuipes* ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ฉีดเข้าใต้ผิวหนังดักแด้ใหม่ ทั้ง 5 กรรมวิธี คือ การฉายรังสี UVC ที่ระยะเวลา 0 นาที (ชุดควบคุม) 0.5, 1, 5 และ 10 นาที วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ จำนวนซ้ำละ 50 ตัว นำไปบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน สังเกตผลการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สี ความสูง น้ำหนักสด และแห้งของก้านดอกเห็ด

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช่าหิมะบนดักแด้ใหม่

นำเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ผ่านการอบแห้ง อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง มาสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์หาสาร adenosine ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) ตามวิธีการของ Huang *et al.* (2009) โดยใช้ยี่ห้อ Shimadzu คอลัมน์ Restek - USA รุ่น

Ultra IBD ขนาด 4.6×150 มิลลิเมตร ที่มีอนุภาค 5 ไมครอน และตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่กำหนดความยาวคลื่นเท่ากับ 254 นาโนเมตร โดยมีสภาวะที่ใช้สำหรับแยกสาร ได้แก่ สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ น้ำ และ methanol (90:10) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิเมตรต่อนาที ปริมาตรสารที่ฉีดเท่ากับ 5 ไมครอลิตร อุณหภูมิของช่องใส่คอลัมน์เท่ากับ 32 องศาเซลเซียส ใช้สารมาตรฐาน adenosine ของบริษัท Sigma Chemical Corporation เตรียมสารละลายมาตรฐาน adenosine อยู่ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0-50 และ 0-100 ppm เพื่อเปรียบเทียบค่าสารสำคัญในแต่ละกรรมวิธี

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 ในที่มีด เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 มีโคโลนีสีขาวครีม เส้นใยบาง เจริญฟูเล็กน้อย เรียงตัวเป็นวงแหวนซ้อนกันจากตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 6.9 เซนติเมตร (Figure 1a) ในขณะที่ไอโซเลท QSDS1-2 มีโคโลนีสีขาว คล้ายขุยหรือผงแป้งโรยไว้ เส้นใยบาง เจริญเป็นรอยบุ๋มรอบขึ้นขุ่น และฟูเป็นวงแหวนซ้อนกันตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.8 เซนติเมตร (Figure 1b) ส่วนไอโซเลท QSDS1-3 โคโลนีเป็นสีขาว เส้นใยหนาคล้ายสำลี เจริญฟูเป็นวงกลมขน ได้ฝ้าจานเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะตรงกลางโคโลนี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 4.8 เซนติเมตร

(Figure 1c) และไอโซเลท QSDS1-4 โคโลนีมีลักษณะสีขาวนวล เส้นใยหนา เจริญฟูเป็นวงกลมจากบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.7 เซนติเมตร (Figure 1d) เห็นได้ว่าโคโลนีของเชื้อรา *C. tenuipes* จากลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท มีลักษณะที่ต่างกัน จึงนำมาทำการฉายรังสีเพื่อชักนำการกลายพันธุ์ และปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

2. การทดสอบการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *C. tenuipes* โดยการฉายรังสี UVC

จากการนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท บ่มในที่มืดเป็นเวลา 9 วัน พบว่า มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน คือ

ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางขึ้นขุ่นในไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนา คล้ายก้อนสำลี เจริญฟูรอบขึ้นขุ่นเป็นวงกลม ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูรอบขึ้นขุ่นเป็นวงกลม ขยายเป็นวงกว้าง และไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที ไม่มีการเจริญของเส้นใยบนขึ้นขุ่น

ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบเป็นวงกลมบนพื้นผิวอาหาร ในไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยหนา คล้ายก้อนสำลี เจริญฟูบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับ

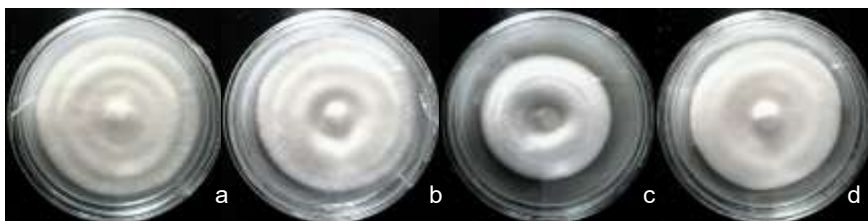


Figure 1. Four isolates of *Cordyceps tenuipes* on PDA at days 20 in dark condition: QSDS1-1 (a), QSDS1-2 (b), QSDS1-3 (c) and QSDS1-4 (d)

ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญรอบขึ้นนูนเป็นวงกลม ในไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยเริ่มเจริญได้เพียงบางส่วนบนขึ้นนูน และไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีสีขาว เส้นใยหนา คล้ายก้อนล้าลี เจริญฟูบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไอโซเลท QSDS1-3 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยปุ่มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางขึ้นนูน ในไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยเจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม ส่วนไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบรอบขึ้นนูนอาหารเป็นวงกลม ในไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนขึ้นนูนอาหารเป็นวงกลม และไอโซเลท QSDS1-3 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที ไม่มีการเจริญของเส้นใยบนขึ้นนูน

ไอโซเลท QSDS1-4 ที่ไม่ฉายรังสี UVC ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญบนพื้นผิวอาหารเป็นรอยปุ่มลึกลงไปเล็กน้อยตรงบริเวณกลางขึ้นนูน ในไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 1 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบติดผิวอาหาร สำหรับไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที ลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบรอบขึ้นนูน และไอโซเลท QSDS1-4 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที มีสีขาว เส้นใยบาง เจริญเรียบติดผิวอาหาร

จากการฉายรังสี UVC ลงบนเชื้อรา *C. tenuipes* มีการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมโดยไอโซเลท QSDS1-1 ก่อนฉายรังสี UVC มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม เส้นใยบาง เจริญฟูเล็กน้อย และเรียงตัวเป็นวงแหวนซ้อนกัน แต่หลังจากได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที ทำให้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีขาว เส้นใยหนา และฟูเป็นวงกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เช่นเดียวกับไอโซเลท QSDS1-2 ที่ก่อนฉายรังสี UVC มีลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยบาง คล้ายขุยหรือผงบั้งโรยไว้ เจริญฟูรอบขึ้นนูน และเป็นวงแหวนซ้อนกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที ลักษณะโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีขาว เส้นใยหนาขึ้น เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Abdel Hamed *et al.* (2012) ที่ได้รายงานว่าการฉายรังสี UV สามารถทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *A. flavus* มีชีวิตรอดหลังการฉายรังสี UV และเกิดการกลายพันธุ์โดยเส้นใยมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันก่อนฉายรังสี

การนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลท บ่มในที่มืดเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 9 วัน เนื่องจากเส้นใยเจริญให้เห็นถึงความแตกต่างที่ 9 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราแต่ละกรรมวิธีแตกต่างกัน เห็นได้ว่ามีลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน Ban *et al.* (1998) รายงานว่าลักษณะเชื้อราที่แข็งแรง จะมีเส้นใยหนา เป็นสีขาว เจริญขึ้นฟูคล้ายก้อนล้าลีขึ้นกับฝาจานเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อราที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี UVC ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาดังกล่าว มีทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที (Figure 2a) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.25 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูคล้ายก้อนล้าลีเป็นวงกลมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ส่วนไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที (Figure 2b) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.95 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร มีลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที (Figure 2c) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.10 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.10 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟู และ ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที (Figure 2d) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.50 เซนติเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย 0.18 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา

เจริญฟู ซึ่งเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา *C. tenuipes* ต่อไป

หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB พบว่า เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร PDA (Figure 3)

3. การทดสอบการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ของเชื้อรา *C. tenuipes* หลังจากการฉายรังสี UVC

3.1 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณถึงเข้าหิมะ *C. tenuipes* ในอาหารเหลว (Sabouraud dextrose broth; SDB)

เมื่อนำเชื้อรา *C. tenuipes* ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วทั้ง 4 ไอโซเลท มาทำการเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว SDB เขย่าในที่มืด เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า อาหารเหลวที่มีเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 0 นาที (ชุดควบคุม) เจริญอยู่ มีลักษณะขุ่น คล้ายวุ้นเหลว ๆ เป็นสีน้ำตาลแดง มีการเพิ่มปริมาณของสปอร์ และเส้นใย โดยเส้นใยเริ่มมีการจับตัวเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ คล้ายเม็ดสาคุ ส่วนเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นขึ้นเล็กน้อย เป็น

วุ้นเหลว ๆ สีน้ำตาลเหลือง เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่มสำหรับไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่น สีน้ำตาล และมีแผ่นเส้นใยสีขาวบาง ๆ ลอยอยู่ด้านบนของอาหารเหลว ไอโซเลท QSDS1-2 (ชุดควบคุม) อาหารเหลวมีลักษณะขุ่น มีสีน้ำตาลเหลือง เป็นวุ้นเหลว ๆ เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่ม ไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นขึ้น สีน้ำตาลแดง เริ่มมีการจับตัวของเส้นใยเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ คล้ายเม็ดสาคุ และมีแผ่นเส้นใยสีขาวบาง ๆ ลอยอยู่บนผิวด้านบนของอาหารเหลว และไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที อาหารเหลวมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย สีน้ำตาลเข้ม เส้นใยไม่จับตัวเป็นกลุ่ม เป็นวุ้นเหลว ๆ (Figure 4) จึงนำเชื้อเหล่านี้ฉีดเข้าสู่ตุ๊กต๋ใหม่เพื่อทดสอบการสร้างก้านดอกเห็ดต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* บนตุ๊กต๋ใหม่

หลังการฉีดเชื้อรา *C. tenuipes* บนตุ๊กต๋ใหม่ เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ในชุดควบคุม เส้นใยเปลี่ยนจากสีครีมเข้มเป็นสีน้ำตาลอ่อน เส้นใยยุบตัวลง ไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดต่อไปได้ (Figure 5a) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.927 กรัม และ

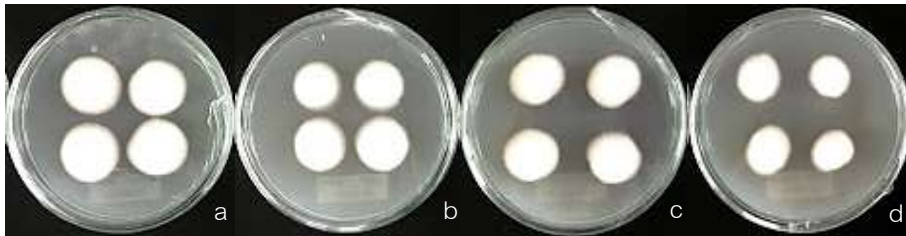


Figure 2. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* colonies at days 9 after exposed for UVC radiation: isolate QSDS1-1 after UVC received for 0.5 (a) and 5 minutes (b), QSDS1-2 after UVC received for 0.5 (c) and 10 minutes (d)

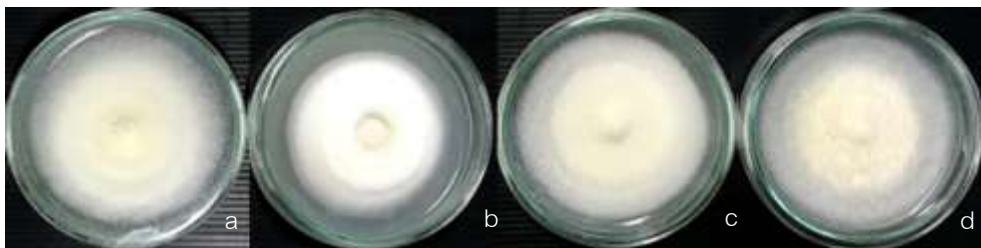


Figure 3. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* at qualified: isolate QSDS1-1 after UVC received for 0.5 (a) and 5 minutes (b), QSDS1-2 after UVC received for 0.5 (c) and 10 minutes (d)

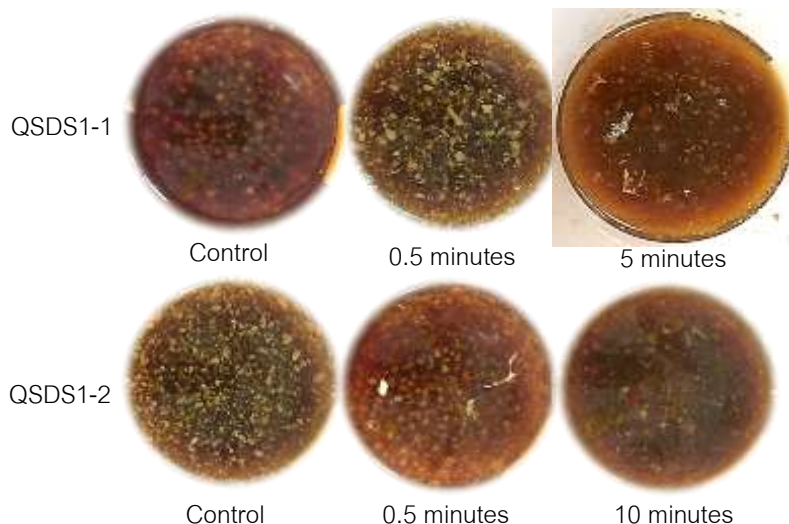


Figure 4. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* in Sabouraud dextrose broth at day 7



Figure 5. Characteristics of *Cordyceps tenuipes* on pupae before injection at day 20: isolate QSDS1-1 (Control) (a) isolate QSDS1-1 after receiving UVC for 0.5 (b) and 5 minutes (c), QSDS1-2 (Control) (d), QSDS1-2 after receiving UVC for 0.5 (e) and 10 minutes (f)

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.194 กรัม ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC 0.5 นาที่ ลักษณะเส้นใยสีขาวฟู คล้ายขุยหรือผงแป้งโรยไว้ จึงไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ (Figure 5b) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.959 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.183 กรัม และกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-1 ฉายรังสี UVC 5 นาที่ (Figure 5c) มีการสร้างก้านดอกเห็ดขึ้นบนดักแด้ใหม่บางส่วน โดยเป็นก้านคล้ายปะการัง มีลักษณะอวบ สีเหลือง ส่วนบริเวณปลายของก้านดอกเห็ดมีสีขาว เป็นกลุ่มสปอร์เล็ก ๆ เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) ก้านดอกเห็ดมีความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.036 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.199 กรัม สำหรับเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 กรรมวิธีที่เป็นชุดควบคุม มีเส้นใยสีขาวฟู คล้ายสำลี และเกิดตุ่มเห็ดเล็ก ๆ ปลายแหลม แทงออกมาบนกลุ่มของเส้นใยที่อัดตัวกันแน่น (ก้านชูสปอร์) มีลักษณะเป็นฝอย ขนาดก้านเล็ก มีความยาวประมาณ 1.6 เซนติเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 0.944 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.193 กรัม (Figure 5d) ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC 0.5 นาที่ ลักษณะเส้นใยมีสีครีม จนถึงน้ำตาลอ่อน เส้นใยยุบตัว และไม่สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ (Figure 3e) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.054 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.199 กรัม และกรรมวิธีที่ฉีดด้วยเชื้อราไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC 10 นาที่ มีการสร้างก้านดอกเห็ดเป็นก้านปลายแหลมสีเหลือง มีความยืดตัวอย่างรวดเร็ว บริเวณปลายก้านดอก เห็ดมีสีขาว และมีสปอร์เล็ก ๆ สีขาวเกาะที่ปลายก้านดอกเห็ด (โคนิเดีย) มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ทั่วบริเวณลำตัวดักแด้ใหม่ (Figure 5f) โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด 1.098 กรัม และค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้ง 0.202 กรัม

3.3 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดงังเจ้าหิมะบนดักแด้ใหม่

จากการนำก้านดอกเห็ดงังเจ้าหิมะที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC 0.5 และ 5 นาที่ และ ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC 0.5 และ 10 นาที่ บนดักแด้ใหม่ จากนั้นนำไปอบแห้ง สกัดสาร และวิเคราะห์ปริมาณสาร adenosine ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา

C. tenuipes ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที่ มีปริมาณสาร adenosine สูงที่สุดเท่ากับ 50.11 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมา คือ ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที่ มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 38.73 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ไม่ฉายรังสี UVC (0 นาที่) มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 27.70 มิลลิกรัม/100 กรัม สำหรับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 5 นาที่ มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 10.42 มิลลิกรัม/100 กรัม รองลงมาคือ ก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 นาที่ มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 8.69 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 ที่ไม่ฉายรังสี UVC (0 นาที่) มีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 6.05 มิลลิกรัม/100 กรัม แสดงให้เห็นว่าก้านดอกเห็ดที่เจริญบนดักแด้ใหม่ จากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที่ มีปริมาณสาร adenosine สูงกว่าก้านดอกเห็ดของ Hong et al. (2007) ได้รายงานเกี่ยวกับปริมาณสาร adenosine ที่พบในส่วนของก้านดอกเห็ดงังเจ้าหิมะ และวัสดุเพาะ มีปริมาณสารที่แตกต่างกัน โดยก้านดอกเห็ดมีปริมาณสาร adenosine เท่ากับ 0.033 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าในส่วนวัสดุเพาะที่มีค่าเพียง 0.013 เปอร์เซ็นต์

เชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ได้รับการฉายรังสี UVC เป็นเวลา 10 นาที่ สามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้อย่างรวดเร็ว มีลักษณะปลายแหลม สีเหลือง และบริเวณปลายก้านดอกเห็ดมีผงสีขาว (โคนิเดีย) เกาะติดอยู่ ขนาดของก้านดอกเห็ดมีความยาวเฉลี่ย 2.00 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.10 และ 0.20 กรัม ตามลำดับ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร adenosine พบมีค่าเท่ากับ 50.11 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Table 1)

Table 1. Adenosine content in fruiting body of *Cordyceps tenuipes* grown on silkworm pupae after exposing to UVC

UVC radiation exposure	Adenosine content (mg /100 g)
QSDS1-1 (0 min)	6.05 e ¹
QSDS1-1 (0.5 min)	8.69 de
QSDS1-1 (5 min)	10.42 d
QSDS1-2 (0 min)	27.70 c
QSDS1-2 (0.5 min)	38.73 b
QSDS1-2 (10 min)	50.11 a

¹ Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at $P \geq 0.05$

สรุป

จากการนำเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1, QSDS1-2, QSDS1-3 และ QSDS1-4 ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการฉายรังสี UVC ที่ระยะเวลา 0.5, 1, 5 และ 10 นาที พบว่า เชื้อรา *C. tenuipes* ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างไปจากเดิม แต่มีเชื้อรา 4 ไอโซเลทที่มีลักษณะที่ดี คือ เชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 5 นาที และไอโซเลท QSDS1-2 หลังฉายรังสี UVC เป็นเวลา 0.5 และ 10 นาที โดยมีลักษณะของโคโลนีสีขาว เส้นใยหนา เจริญฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 3.25, 2.95, 3.10 และ 2.50 เซนติเมตรตามลำดับ และมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.18, 0.18, 0.10 และ 0.18 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อรา *C. tenuipes* ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ 9 วันไปเพาะเลี้ยงบนดักแด้ไหม พบว่า จากข้อมูลในตารางที่ 1 ทำให้เห็นได้ว่าปริมาณของสาร adenosine ของก้านดอกเห็ดที่เจริญจากเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 ที่ฉายรังสี UVC และไม่ฉายรังสี UVC มีปริมาณสาร adenosine สูงกว่าเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-1 แสดงว่าเชื้อรา *C. tenuipes* ไอโซเลท QSDS1-2 มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าในเชิงอุตสาหกรรมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ เชียงใหม่ กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ให้การสนับสนุนดักแด้ไหมและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abdel Hameed, A.A, A.M. Ayesh, M. Abdel Razik and H.F. Abdel Mawla, 2012. Ultraviolet radiation as a controlling and mutating agent of environmental fungi. Management of Environmental Quality: An International Journal 24(1): 53-63.
- Ban, K.W., D.K. Park, J.O. Shim, Y.S. Lee, C.H. Park, J.Y. Lee and M.W. Lee. 1998. Cultural characteristics for inducing fruiting-body of *Isaria japonica*. The Korean Journal of Mycology 26(3): 380-386.
- Brown, A.E. 2010. Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology. McGraw-Hill Book Company, New York. 447 p.
- Chen, X.M., J.X. Lu, Y.D. Zhang, J.T. He, X.Z. Guo, G.Y. Tian and L.Q. Jin. 2008. Studies of

- macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes*. International Journal of Biological Macromolecules 43(3): 252-256.
- Du, L., J. Song, H. Wang, P. Li, Z. Yang, L. Meng and L. Teng. 2012. Optimization of the fermentation medium for *Paecilomyces tenuipes* N45 using statistical approach. African Journal of Microbiology Research 6(32): 6130-6141.
- Hong, I.P., S.H. Nam, G.B. Sung, I.M. Chung, H. Hur, M.W. Lee, M.K. Kim and S.X. Guo. 2007. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. Mycobiology 35(4): 215-218.
- Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zho. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12): 957-961.
- Kepler, R.M., J.J. Luangsa-ard, N.L. Hywel-Jones, C.A. Quandt, G.H. Sung, S.A. Rehner, M.C. Aime, T.W. Henkel, T. Sanjuan, R. Zare, M. J. Chen, Z.Z. Li, A.Y. Rossman, J.W. Spatafora and B. Shrestha. 2017. A phylogenetic-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). International Mycological Association Fungus 8(2): 335-353.
- Lu, R., T. Miyakoshi, G.Y. Tian and T. Yoshida. 2007. Structural studies of *Paecilomyces tenuipes* Samson polysaccharide-part-2. Carbohydrate Polymer 67(3): 343-346.
- Luerdara, K., J. Kulsalin, S. Buranapanichpan and T. Tapingkae. 2006. Growth of gold cordyceps (*Cordyceps militaris*) on pupae of Nanglai Thai native silkworm and eri silkworm. Journal of Agriculture 32(1): 95-102.
- Ma, C.X., D.L. Jiang and X.Y. Wei. 2011. Mutation breeding of *Emericella foeniculicola* TR21 for improved production of tanshinone. Process Biochemistry 46(10): 2059-2063.
- Radha, S., R.H. Ba, A. Sridevi, N.B.L. Prasad and G. Narasimha. 2012. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. European Journal of Experimental Biology 2(5): 1517-1528.
- Xu, C.P. and J.W. Yun. 2004. Influence of aeration on the production and the quality of the exopolysaccharides from *Paecilomyces tenuipes* C240 in a stirred-tank fermenter. Enzyme and Microbial Technology 35(1): 33-39.
- Xu, C.P., S.W. Kim, H.J. Hwang and J.W. Yun. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. Bioresource Technology 97(5): 770-777.
- Xu, C.P., S.W. Kim, H.J. Hwang, J.W. Choi and J.W. Yun. 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. Process Biochemistry 38(7): 1025-1030.