ผลของการใช้แมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหาร SDB (Sabouraud Dextrose Broth) และวัสดุเพาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช้าสีทอง *Cordyceps militaris* (L.) Link

Effects of Edible Insects as Ingredient in Sabouraud Dextrose Broth and Culture Media on Growth of Gold Cordyceps, *Cordyceps militaris* (L.) Link

โสภิณ คำแสนศรี[1] จิราพร กุลสาริน[1*] ไสว บูรณพานิชพันธุ์[1] ธัญญา ทะพิงค์แก[2] และ สิริญา คัมภิโร[1]

Sopin Khumsaensri[1], Jiraporn Kulsarin[1*], Sawai Buranapanichpan[1], Tanya Tapingkae[2] and Siriya Kumpiro[1]

[1]ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

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

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีและพัฒนาการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50300

[2]Department 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: 27 November 2018; Accepted: 18 January 2019)

Abstract: Gold cordyceps (*Cordyceps militaris* (L.) Link) contained of cordycepin and adenosine as bioactive compounds, which described as a medicine and functional food. It can grow on several insect species, especially edible insects in order Lepidoptera, Orthoptera and Coleoptera. The objective was to study the effect of edible insects as an ingredient in Sabouraud dextrose broth (SDB) and the culture media on the growth and the bioactive compound of *C. militaris*. The four tested edible insect species were pre-pupa and pupa of silkworm (*Bombyx mori*), adult cricket (*Gryllus bimaculatus*), bamboo caterpillar (*Omphisa fuscidentalis*) and mealworm (*Tenebrio molitor*). The result revealed that the SDB mixed with cricket yielded the highest viability of 3.5×10^3 cfu/ml. Then, the media were blended with two kinds of media, Riceberry rice + all tested edible insects and Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) rice + all tested edible insects. It was obvious that *C. militaris* culturing on KDML105 rice + silkworm pupa gave the maximum fruiting body length of 3.14 cm whereas the average highest fresh and dry weights, 5.56 and 1.17 g, obtained from Riceberry rice + silkworm pre-pupa medium. The content of bioactive compounds, cordycepin and adenosine, in the fruiting bodies and the media were analyzed. The highest cordycepin content (1,266.74 mg/100 g) was found in fruiting body culturing on KDML105 rice + cricket medium while the highest adenosine content (94.91 mg/100 g) was found in KDML105 rice + cricket medium. The result of this study will be a guideline to develop the technique of gold cordyceps culture for farmers and researchers in the future.

Keywords: Culture media, edible insects, *Cordyceps militaris*, Sabouraud dextrose broth

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (*Cordyceps militaris* (L.) Link) มีสารออกฤทธิ์ที่มีสรรพคุณทางยาและใช้บริโภคเพื่อปรับสมดุลในร่างกาย ได้แก่ cordycepin และ adenosine เห็ดชนิดนี้เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตได้ดีในแมลงหลายชนิดในอันดับ Lepidoptera, Orthoptera และ Coleoptera โดยเฉพาะแมลงกินได้ จึงทำการศึกษาผลของแมลงกินได้เป็นส่วนผสมในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) และวัสดุเพาะ ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง โดยใช้แมลงกินได้ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก ผลการศึกษาพบว่า อาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ให้ค่าความมีชีวิตสูงสุดที่ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำอาหาร SDB นี้ ถ่ายลงวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยข้าวไรซ์เบอรี่ (Riceberry) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ผสมแมลงกินได้ชนิดต่าง ๆ พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม มีความยาวสูงสุดเท่ากับ 3.14 เซนติเมตร ขณะที่น้ำหนักสดและแห้งเฉลี่ยสูงสุดของก้านดอกเห็ดได้จากการเพาะบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีค่าเท่ากับ 5.56 และ 1.17 กรัม ตามลำดับ ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ตรวจพบว่ามีสาร cordycepin ปริมาณมากที่สุด เท่ากับ 1,266.74 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วน adenosine พบมากที่สุดในวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ปริมาณ 94.91 มิลลิกรัม/100 กรัม ผลการศึกษานี้ช่วยให้เห็นแนวทางในการพัฒนาและเสริมสร้างเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้าสีทองแก่เกษตรกรและนักวิจัยในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: วัสดุเพาะ แมลงกินได้ *Cordyceps militaris* Sabouraud dextrose broth

คำนำ

เห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (Gold Cordyceps) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cordyceps militaris* (L.) Link เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงอันดับ Lepidoptera และ Coleoptera (Sato and Shimazu, 2002) มีสรรพคุณทางยาสูง จึงถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ หรือบริโภคเพื่อปรับสมดุลและฟื้นฟูระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเฉ้า เพื่อผลิตก้านดอกเห็ด (fruiting body) และเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ในก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง สารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง ได้แก่ สาร cordycepin ช่วยต่อต้านมะเร็ง และรักษาสมดุลของร่างกาย สาร adenosine ช่วยชะลอความชราและ cordycepic acid ช่วยเพิ่มเมแทบอลิซึมในเลือด ลดอาการหอบหืด โรคหัวใจขาดเลือด เป็นต้น (Almagro *et al*., 2011; Dong *et al*., 2012; Khan *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010) โดยเฉพาะสาร cordycepin เป็นสารที่มีปริมาณสูงในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง และมีมูลค่าทางการค้า จากการศึกษาของ Zhang *et al*. (2016) พบว่า การเจริญของเซลล์เห็ด และปริมาณของสารออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อรา สารอาหารที่เหมาะสม (แหล่งไนโตรเจน คาร์บอน และแร่ธาตุต่าง ๆ) และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม Mao and Zhong (2006) รายงานว่า การเติมอาหารเสริมเข้าไปในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น protein, yeast extract และ peptone เป็นต้น ช่วยในเรื่องของการเจริญของเซลล์เห็ด ส่วนแหล่งคาร์บอน เช่น adenine, adenosine, glucose, glycine, L-aspartic acid และ L-glutamine ช่วยเสริมสร้างสาร cordycepin ในเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง (Mao *et al*., 2005; Masuda *et al*., 2007) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองต้องการสารจำพวกโปรตีน และกรดอะมิโนเป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาของ Hong *et al*. (2010) มีการฉีดเชื้อเห็ดถั่งเฉ้าสีทองเข้าไปในดักแด้ไหม (*Bombyx mori*) แล้วเกิดก้านดอกเห็ดขึ้น และ Sato and Shimazu (2002) รายงานว่า เชื้อเห็ดถั่งเฉ้าสีทองสามารถสร้างก้านดอกเห็ดได้ในหนอนนก (*Tenebrio molitor*) ระยะดักแด้ นอกจากนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ธัญพืชเป็นวัสดุเพาะ พบว่าข้าวไรซ์เบอรี่ผสมดักแด้ไหม และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม มีแนวโน้มนำไปพัฒนาเป็นวัสดุเพาะเห็ดถั่งเฉ้าสีทองได้ ปัจจุบันแมลงได้รับความนิยมนำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารของมนุษย์และสัตว์มากขึ้น (van

Huis *et al*., 2013) จึงมีการเพาะเลี้ยงแมลงเพิ่มขึ้นจนกลายเป็นระดับอุตสาหกรรม ซึ่งแมลงที่นิยมนำมาเป็นอาหารมีหลายชนิด เช่น ดักแด้ไหม จิ้งหรีด หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก เป็นต้น แต่เนื่องด้วยแมลงเหล่านี้มีโปรตีนและกรดอะมิโนสูง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงนำแมลงกินได้ชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อราเห็ดในอาหารเหลว วัสดุเพาะ รวมทั้งปริมาณของสารออกฤทธิ์ในก้านดอกเห็ดที่เพิ่มขึ้น ช่วยลดต้นทุนการผลิตเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง และเป็นแนวทางช่วยเพิ่มมูลค่าให้แก่แมลงกินได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองในอาหารเหลวที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

ทำการเตรียมแมลง โดยนำแมลงสด 5 ชนิด ได้แก่ หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ (silkworm pre-pupa) และดักแด้ไหม (silkworm pupa) พันธุ์ J108 x นางลาย สระบุรี ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ (cricket) หนอนเยื่อไผ่ (bamboo caterpillar) และหนอนนก (mealworm) ล้างให้สะอาด ต้มในน้ำเดือด 30 นาที ผึ่งให้แห้งและใส่ถุงพลาสติก และแช่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยนำมีดตัดเชื้อรา *C. militaris* บนจานอาหารวุ้น ขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยชิ้นวุ้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ พันขอบจานด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ตามแนวทางของ Hong *et al*. (2010) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ทำการวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth (SDB) ที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นอาหารเหลวที่ไม่ผสมแมลง ทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ โดยทำการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว โดยนำเชื้อรา *C. militaris* ที่เตรียมไว้บนอาหารวุ้น ขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงในอาหารเหลว จำนวน 4 ชิ้นต่อซ้ำ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในห้องมืด อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส ตามวิธีการของ Luerdara *et al*. (2016) บันทึกผลความมีชีวิต (viability) มีหน่วยเป็นหน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (cfu/ml) และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา (dry mass) ทุก ๆ 3 วัน หลังจากเขย่า รวมเวลา 21 วัน

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

ทำการเตรียมวัสดุเพาะโดยนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และข้าวไรซ์เบอรี่ (Riceberry) ผสมแมลงแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ ได้แก่ วัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม พันธุ์ J108 x นางลาย สระบุรี ตัวเต็มวัยจิ้งหรีดพันธุ์ทองดำ หนอนเยื่อไผ่ และหนอนนก ในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 และแบ่งใส่ขวดเพาะเตรียมสารอาหารสำหรับหุงโดยนำมันฝรั่งและข้าวโพดฝักอ่อนต้มในน้ำกลั่น กรองน้ำออกและผสมกับสารอาหารเสริมที่ชั่งไว้ผสมให้เข้ากัน เทสารอาหารผสมดังกล่าวลงในขวดเพาะ ขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดเพาะนำไปนึ่งและผึ่งเย็น

ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดสอบการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมเป็นวัสดุเพาะไม่ผสมแมลง รวมทั้งหมด 6 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ โดยนำอาหารเหลวที่ดีที่สุดจากการทดลองแรก ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ใส่ลงบนวัสดุเพาะ และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18-22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพมืด จากนั้นให้แสง 24 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนเก็บเกี่ยวทำการบันทึกน้ำหนักเห็ดถั่งเฉ้าสีทองก่อนและหลังอบ ความสูงของก้านดอกเห็ด เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่หายไปของเห็ดถั่งเฉ้าสีทอง

จากนั้นทำการวิเคราะห์สาร cordycepin และ adenosine ในเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ผสมแมลงกินได้ต่างชนิดกัน โดยวางแผนแบบ 2x6x2 factorial

experiment in CRD จำนวน 2 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1) วัสดุเพาะเห็ดถั่งเช้าสีทอง 2 ชนิด คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวไรซ์เบอรี่ ปัจจัยที่ 2) แมลงกินได้ที่ผสมวัสดุเพาะรวมถึงที่ไม่ผสมแมลง รวม 6 แบบ และปัจจัยที่ 3) ก้านดอกเห็ดถั่งเช้าสีทองและวัสดุเพาะ นำเห็ดถั่งเช้าสีทองอบแห้งบดละเอียด 1 กรัม มาสกัดสารด้วยน้ำกลั่น และ methanol อย่างละ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และกรองเอาเฉพาะสารสกัดใส เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดเห็ดถั่งเช้าสีทอง ด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) (Huang *et al*., 2009) และทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเช้าสีทองในอาหารเหลวที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

จากการนำเชื้อรา *C. militaris* เพาะเลี้ยงในอาหาร SDB ที่ผสมแมลงต่างชนิดกัน พบว่า 3 วัน หลังจากเขย่า อาหารเหลวทุกกรรมวิธี ค่าความมีชีวิตน้อย และไม่เกิดการสร้างสปอร์ มีการเจริญแบบ turbid โดยอาหารเหลวมีลักษณะขุ่นขึ้นเล็กน้อย เมื่อผ่านไป 6 วัน ทุกกรรมวิธีมีลักษณะขุ่นมากขึ้น มีการเพิ่มปริมาณของสปอร์และเส้นใยในอาหารเหลว โดยเส้นใยเริ่มจับตัวเป็นกลุ่มตะกอนเล็ก ๆ เรียกการเจริญแบบนี้ว่า flocculent มีน้ำหนักเชื้อราลดลง และและไม่สร้างสปอร์ หรือสร้างน้อย แต่เมื่อผ่านไป 9-21 วัน เป็นการเจริญแบบ pellicle คือมีแผ่นเส้นใย บาง ๆ ลอยอยู่ด้านบนอาหารเหลว หรือติดบริเวณขอบด้านข้างของขวดอาหาร มีลักษณะหนาและอัดตัวแน่น โดยอาหารเหลวทุกกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลงแตกต่างกับกรรมวิธีที่มีแมลงเป็นส่วนผสม ซึ่งอาหารเหลวที่ไม่ผสมแมลงมีลักษณะขุ่นน้อย และแผ่นเส้นใยมีลักษณะบางกว่า เมื่อตรวจความมีชีวิตของเชื้อรา *C. militaris* พบว่า หลังเขย่า 3-6 วัน มีค่าความมีชีวิตของทุกกรรมวิธีน้อยกว่า 2.5×10^2 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร หลังจากเขย่า 9 วัน กรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม เพิ่มเป็น 3.5×10^2, 3.1×10^2 และ 2.8×10^2 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเขย่าไปถึง 12 วัน มีน้ำหนักของเชื้อราเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และอาหารเหลวผสมจิ้งหรีดมีน้ำหนักเชื้อรา และค่าความมีชีวิตสูงที่สุด คือ 0.34 กรัม และ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ไหม มีค่าความมีชีวิตเท่ากับ 2.5×10^3 และ 9.5×10^2 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นพบว่า เชื้อรามีค่าความมีชีวิตลดลงเรื่อย ๆ และเชื้อแผ่กระจาย (Table 1, 2)

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว SDB ที่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า ในช่วงแรกมีการเกิดบลาสโตสปอร์ (blastospores) และภายใต้แรงเหวี่ยงทำให้เส้นใยขาดออกจากบลาสโตสปอร์ และเพิ่มปริมาณมากขึ้น ทำให้อาหารเหลวข้นขึ้น แล้วอัดแน่นเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวอาหารเหลว หรือที่เรียกกันว่า รกถั่งเช้า ซึ่งลักษณะของอาหารเหลวนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Shrestha *et al*. (2006) ที่รายงานการเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว โดยช่วงแรกมีการเกิดโคนิเดีย เส้นใยและแผ่นเส้นใยตามลำดับ ทั้งนี้การเจริญของเชื้อราในลักษณะที่กล่าวมา ขึ้นอยู่กับแมลงชนิดต่าง ๆ ที่มีสารอาหารแตกต่างกัน จากค่าความมีชีวิตของ

Table 1. Viability of Sabouraud dextrose broth mixed with edible insect after inoculated with *Cordyceps militaris*

Edible insects	Viability of *C. militaris* (cfu/ml)						
	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days	18 days	21 days
Silkworm pupa	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	2.8×10^2	9.5×10^2	-	-	-
Silkworm pre-pupa	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	3.1×10^2	2.5×10^3	-	-	-
Cricket	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	3.5×10^2	3.5×10^3	-	-	-
Bamboo caterpillar	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	4.0×10^2	-	-	-
Mealworm	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	-	-	-
Without insect	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	$<2.5\times10^2$	-	-

Table 2. Dry mass of Sabouraud dextrose broth mixed with edible insect after inoculated with *Cordyceps militaris*

Edible insects	Dry mass of *C. militaris* (g)						
	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days	18 days	21 days
Silkworm pupa	0.17 bc[1]	0.06 b	0.10 ab	0.10 bc	0.20 ab	0.19 ab	0.11 bc
Silkworm pre-pupa	0.25 ab	0.18 ab	0.10 ab	0.29 a	0.21 ab	0.08 b	0.05 c
Cricket	0.28 a	0.14 ab	0.18 a	0.34 a	0.25 a	0.27 a	0.16 ab
Bamboo caterpillar	0.19 ab	0.24 a	0.18 a	0.29 a	0.14 ab	0.24 ab	0.13 abc
Mealworm	0.22 ab	0.08 ab	0.06 ab	0.17 b	0.19 ab	0.18 ab	0.24 a
Without insect	0.07 c	0.13 ab	0.04 b	0.07 c	0.10 b	0.09 ab	0.08 bc

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

เชื้อรา *C. militaris* พบว่า อาหารเหลวที่ผสมแมลงกินได้ช่วยกระตุ้นการสร้างบลาสโตสปอร์ภายในอาหารเหลว ทำให้มีค่าความมีชีวิตสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งหลังการเขย่า 12 วัน สปอร์ได้พัฒนาไปเป็นเส้นใย เกิดการแผ่กระจายในจานเพาะเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง พบไม่มีการกระตุ้นการสร้างสปอร์ จึงมีปริมาณบลาสโตสปอร์น้อย มีค่าความมีชีวิตน้อยกว่า 2.5×10^2 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และหลังจากเขย่าอาหารเหลว 15 วันขึ้นไป จึงเกิดการแผ่กระจายของเส้นใยในจานเพาะเชื้อ แสดงว่าสารอาหารและระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อรา ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. militaris* ในอาหารเหลว SDB ดังนั้น จึงเลือกใช้อาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ที่มีระยะเวลาการเขย่า 12 วันในการทดลองต่อไปเนื่องจากมีน้ำหนักแห้งของเชื้อรา และ ค่าความมีชีวิตสูงที่สุด

การศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน

จากการคัดเลือกเชื้อรา *C. militaris* ในอาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด ระยะเวลาเขย่า 12 วัน ใส่ลงบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวไรซ์เบอรี่ ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า หลังจากปลูกเชื้อรา *C. militaris* 2 สัปดาห์ ทุกกรรมวิธีมีเส้นใยสีขาวปกคลุมทั่ววัสดุเพาะมีลักษณะฟู และเจริญลงไปถึงก้นขวด เมื่อให้แสงนาน 24 ชั่วโมง เส้นใยของทุกกรรมวิธีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม แต่ไม่เกิดก้านดอกเห็ด (fruiting body) หลังจากให้แสง 2 สัปดาห์ ทุกกรรมวิธีเริ่มมีก้านดอกเห็ดขึ้นบนวัสดุเพาะ และก้านดอกเห็ดมีความสูงเพิ่มขึ้น เมื่อให้แสงครบ 5 สัปดาห์ พบว่า ก้านดอกเห็ดจากกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหมมีความสูงเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 3.14 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง และผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่ จิ้งหรีด และหนอนนก ส่วนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมหนอนเยื่อไผ่ ไม่ผสมแมลง หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ ดักแด้ไหม และจิ้งหรีด มีจำนวนก้านดอกเห็ดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนนก (Figure 1) และพบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 3.12 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง ผสมดักแด้ไหม จิ้งหรีด และหนอนเยื่อไผ่ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนนก ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 0.77 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด ไม่ผสมแมลง ผสมหนอนเยื่อไผ่ (Table 3)

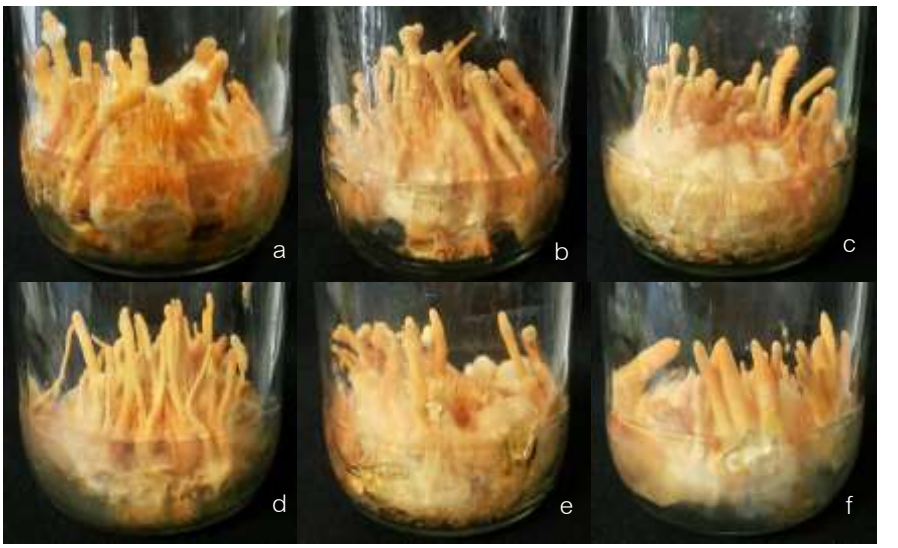

Figure 1. Characteristics of gold cordyceps on KDML105 rice mixed with edible insects after 5 weeks in light condition: silkworm pupa (a), silkworm pre-pupa (b), cricket (c), bamboo caterpillar (d), mealworm (e) and without insect (f)

Table 3. Growth of *Cordyceps militaris* on KDML105 rice mixed with edible insects

Edible insects	Fuiting body length (cm)	No. of fruiting body	Fruiting body weight (g)		Weight loss (%)
			Fresh	Dry	
Silkworm pupa	3.14 a[1]	22.0 a	2.45 ab	0.69 ab	71.84
Silkworm pre-pupa	2.80 ab	22.8 a	3.12 a	0.77 a	75.32
Cricket	2.42 b	20.8 ab	2.07 abc	0.61 b	70.53
Bamboo caterpillar	2.49 b	26.8 a	1.71 ab	0.42 c	75.44
Mealworm	2.40 b	13.2 b	1.01 bc	0.28 d	72.28
Without insect	2.83 ab	24.0 a	2.84 ab	0.58 b	79.58

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

สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *C. militaris* ในอาหาร SDB ผสมจิ้งหรีด บนข้าวไรซ์เบอรี่ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ เมื่อให้แสงครบ 5 สัปดาห์ พบว่า ก้านดอกเห็ดในทุกกรรมวิธีที่เพาะเลี้ยงในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมแมลงชนิดต่าง ๆ มีความสูงเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง ส่วนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ หนอนนก และดักแด้ไหม มีจำนวนก้านดอกเห็ดเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) มีค่าเท่ากับ 14.60, 14.60 และ 14.20 ก้านต่อขวดเพาะ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลง (Figure 2) และพบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 5.56 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมหนอนนกดักแด้ไหม และจิ้งหรีด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมหนอนเยื่อไผ่และไม่ผสมแมลง ส่วนน้ำหนักแห้ง พบว่า ก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ มีน้ำหนักสดสูงที่สุดเท่ากับ 1.17 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมจิ้งหรีด

และหนอนนก แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม หนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลง (Table 4)

จากผลการศึกษาการเจริญของเชื้อราเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะที่ได้สารอาหารจากแมลงต่างชนิดกัน พบว่า ก้านดอกเห็ดบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีความสูงมากกว่าบนข้าวไรซ์เบอรี่ โดยวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมกับดักแด้ไหม มีความสูงเฉลี่ยของก้านดอกเห็ดมากที่สุด เท่ากับ 3.14 เซนติเมตร และมีจำนวนก้านดอกเห็ดบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมแมลงกินได้มากกว่าบนข้าวไรซ์เบอรี่ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Leejae *et al.* (2015) รายงานว่า เห็ดถั่งเฉ้าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่เจริญเติบโตเป็นก้านดอกเห็ดน้อยกว่าบนข้าวขาวดอกมะลิ 105

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะผสมแมลงต่างชนิดกัน

จากการนำเห็ดถั่งเฉ้าสีทองอบแห้งไปสกัดสารออกฤทธิ์สำคัญ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ในก้านดอกเห็ด และวัสดุเพาะที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ให้สาร cordycepin และ adenosine ในปริมาณสูงที่สุด โดยก้านดอกเห็ดพบสาร cordycepin ปริมาณ 1,266.74 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) กับกรรมวิธีที่ผสมดักแด้ไหม และข้าวไรซ์เบอรี่ผสมจิ้งหรีด

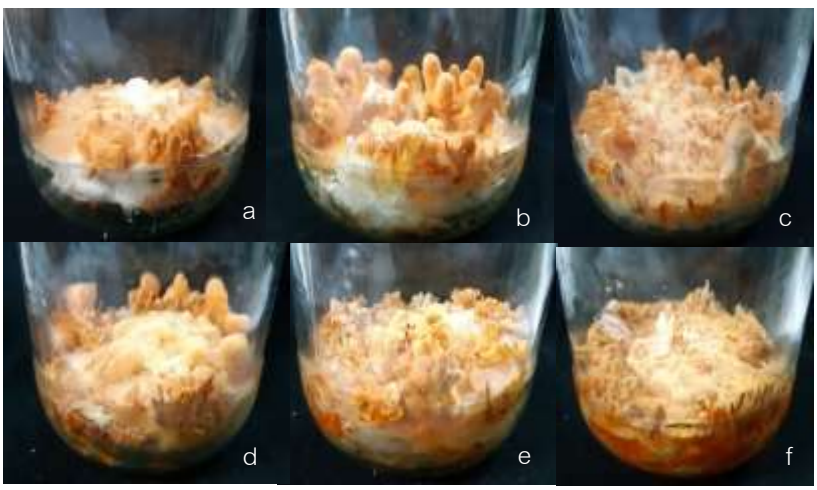

Figure 2. Characteristics of gold cordyceps on Riceberry rice mixed with edible insects after 5 weeks in light condition: silkworm pupa (a), silkworm pre-pupa (b), cricket (c), bamboo caterpillar (d), mealworm (e) and without insect (f)

Table 4. Growth of *Cordyceps militaris* on Riceberry rice mixed with edible insects

Edible insects	Fruiting body length (cm)	No. of fruiting body	Fruiting body weight (g)		Weight loss (%)
			Fresh	Dry	
Silkworm pupa	1.61 a[1]	14.20 a	4.13 ab	0.84 b	79.66
Silkworm pre-pupa	1.73 a	14.60 a	5.56 a	1.17 a	78.96
Cricket	1.60 a	11.80 ab	4.02 ab	0.94 ab	76.62
Bamboo caterpillar	1.36 ab	9.80 bc	3.86 b	0.79 b	79.53
Mealworm	1.58 a	14.60 a	5.02 ab	0.89 ab	82.27
Without insect	1.10 b	7.00 c	3.48 b	0.75 b	78.45

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

แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง (Table 5) ส่วนสาร adenosine มีปริมาณสูงที่สุดในวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 94.91 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากกรรมวิธีที่ไม่ผสมแมลง (Table 6)

จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ผสมแมลงกินได้ของแต่ละชนิด คือ ดักแด้ไหม หนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ จิ้งหรีด หนอนเยื่อไผ่ และไม่ผสมแมลงโดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร cordycepin ในก้านดอกเห็ดถั่งเช้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะเห็นได้ว่ามีมากกว่าในก้านดอกเห็ดบนข้าวไรซ์เบอรี่ ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Leejae *et al.* (2015) ที่มีสารสกัดจากก้านเห็ดถั่งเช้าสีทองบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 สูงกว่าสารสกัดจากก้านดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงบนข้าวไรซ์เบอรี่ นอกจากนี้ผลวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญ ในกรรมวิธีที่มีการผสมแมลงในวัสดุเพาะ ส่วนใหญ่มีสาร cordycepin และ adenosine สูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่แมลง โดยแมลงที่ใช้ในการวิจัยนี้ มีทั้งระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ซึ่งระยะการเจริญเติบโตของแมลงอาจมีปริมาณสารอาหาร หรือกรดอะมิโนที่ส่งผลต่อการเสริมสร้างสารออกฤทธิ์ในปริมาณแตกต่างกัน จึงเป็นแนวทางในการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของแมลงกินได้ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและสารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช้าสีทองเพิ่มเติมต่อไป

Table 5. Contents of cordycepin in media and fruiting body of gold cordyceps (mg/100g)

Edible insects	KDML 105 rice		Riceberry rice	
	Fruiting body	Media	Fruiting body	Media
Silkworm pupa	1172.32 a[1]	262.07 h	440.29 fg	179.21 hi
Silkworm pre-pupa	974.06 bc	293.19 gh	601.62 ef	171.30 hi
Cricket	1266.74 a	312.91 gh	1136.78 ab	183.23 hi
Bamboo caterpillar	805.49 cd	293.19 gh	257.84 h	145.65 hi
Mealworm	715.68 de	44.94 i	887.52 cd	34.27 i
Without insect	843.82 cd	65.42 i	535.99 f	27.76 i

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

Table 6. Contents of adenosine in media and fruiting body of gold cordyceps (mg/100g)

Edible insects	KDML 105 rice		Riceberry rice	
	Fruiting body	Media	Fruiting body	Media
Silkworm pupa	30.20 bcd[1]	43.86 bc	21.64 bcd	15.93 bcd
Silkworm pre-pupa	24.72 bcd	51.90 b	19.26 bcd	13.18 cd
Cricket	31.45 bcd	94.91 a	34.09 bcd	21.40 bcd
Bamboo caterpillar	23.80 bcd	11.59 cd	16.21 bcd	13.50 cd
Mealworm	22.09 bcd	21.24 bcd	19.48 bcd	16.64 bcd
Without insect	16.50 bcd	6.33 cd	21.91 bcd	15.97 bcd

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

สรุป

อาหารเหลว SDB ที่ได้สารอาหารจากจิ้งหรีดเมื่อไปเขย่าในสภาพมืด นาน 12 วัน ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 18-22 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อรา *C. militaris* มีการเจริญเติบโตในอาหารเหลวดีที่สุด โดยมีค่าความมีชีวิตสูงที่สุด เท่ากับ 3.5×10^3 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีความงอกของเชื้อราสูงที่สุด

หลังจากใส่อาหารเหลวดังกล่าวลงบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมดักแด้ไหม ให้ก้านดอกเห็ดมีความสูงที่สุดที่ 3.14 เซนติเมตร แต่ก้านดอกเห็ดถั่งเฉ้าสีทองบนวัสดุเพาะข้าวไรซ์เบอรี่ผสมหนอนไหมก่อนเข้าดักแด้ ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเฉลี่ยมากที่สุด อีกทั้งสารออกฤทธิ์หลัก คือ cordycepin และ adenosine พบว่า วัสดุเพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผสมจิ้งหรีด ให้ก้านดอกเห็ดที่มีสาร cordycepin สูงที่สุด และในวัสดุเพาะมีสาร adenosine มากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

Almagro, L., A.B. Sabater-Jara, S. Belchi-Navarro, F. Fernandez-Perez, R. Bru and M.A. Pedreno. 2011. Effect of UV light on secondary metabolite biosynthesis in plant cell cutures elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate. pp. 115-136. *In*: H. Vasanthaiah (ed.). Plants and Environment. InTech, Rijeka.

Dong, J.Z., M.R. Liu, C. Lei, X.J. Zheng and Y. Wang. 2012. Effects of selenium and light wavelengths on liquid cuture of *Cordyceps militaris* Link. Applied Biochemistry and Biotechnology 166(8): 2030-2036.

Hong, I.P., P.D. Kang, K.Y. Kim, S.H. Nam, M.Y. Lee, Y.S. Choi, N.S. Kim, H.K. Kim, K.G. Lee and R.A. Humber. 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. Mycobiology 38(2): 128-132.

Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zhou. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12): 957-961.

Khan, M.A., M. Tania, D. Zhang and H. Chen. 2010. Cordyceps mushroom: A potent anticancer nutraceutical. The Open Nutraceuticals Journal 3(1): 179-183.

Leejae, S., N. Bakasatae, W. Intamon, C. Korkitpaisal, T. Sudsai and A. Prapaiwong. 2015. Antioxidant activity of caterpillar fungus (*Cordyceps militaris*) grown on rice berry and jasmine rice. pp. 210-217. *In*: Proceedings of RSU National Research Conference 2015. Rangsit University, Pathum Thani. (in Thai)

Luerdara, K., J. Kulsarin, S. Buranapanichpan and T. Tapingkae. 2016. Growth of gold cordyceps (*Cordyceps militaris*) on pupae of Nanglai Thai native silkworm and eri silkworm. Journal of Agriculture 32(1): 95-102. (in Thai)

Mao, X.B. and J.J. Zhong. 2006. Significant effect of $NH4^+$ on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology 38: 343-350.

Mao, X.B., T. Eksriwong, S. Chauvatcharin and J.J. Zhong. 2005. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of

medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Process Biochemistry 40: 1667-1672.

Masuda, M., E. Urabe, H. Honda, A. Sakurai and M. Sakakibara. 2007. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology 40(5): 1199-1205.

Sato, H. and M. Shimazu. 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. Applied Entomology and Zoology 37(1): 85-92.

Shrestha, B., W.H. Lee, S.K. Han and J.M. Sung. 2006. Observations on some of the mycelial growth and pigmentation characteristics of *Cordyceps militaris* isolates. Mycobiology 34(2): 83-91.

van Huis, A., J. van Itterbeeck, H. Klunder, E. Mertens, A. Halloran, G. Muir and P. Vantomme. 2013. Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO Forestry Paper 171. FAO, Rome.

Zhang, A.L., J.H. Lu, N. Zhang, D. Zheng, G.R. Zhang and L.R. Teng. 2010. Extraction, purification and anti-tumor activity of polysaccharide from mycelium of mutant *Cordyceps militaris*. Chemical Research in Chinese Universities 26(5): 798-802.

Zhang, Q., Y. Liu, Z. Di, C.C. Han and Z. Liu. 2016. The strategies for increasing cordycepin production of *Cordyceps militaris* by liquid fermentation. Fungal Genomics and Biology 6: 134, doi: 10.4172/2165-8056.1000134.