การเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็งจากธัญพืชต่างชนิด

Growth of *Cordyceps militaris* Mycelium on Solid Media Prepared from Difference Grains

ปวีนา น้อยทัพ[1*], เพชรรุ้ง เสนานุช[1] และ จตุรพร รักษ์งาร[2]

Paweena Noitup[1*], Petrung Sananuch[1] and Jaturaporn Rakngan[2]

[1]ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ม.นเรศวร พิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ม.นเรศวร พิษณุโลก 65000

[1]Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

[2]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*Corresponding author: paweenan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ธาตุอาหารที่ผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญของเส้นใยและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงหาแหล่งอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของถั่งเช่าสีทอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของธัญพืช 8 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเหนียว ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวไรซ์เบอรี่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด และลูกเดือย พบว่า อาหารแข็งที่มีส่วนผสมของข้าวไรซ์เบอรี่ ให้การเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองได้ที่ดีสุด ที่ระยะเวลา 18 วัน

คำสำคัญ: เห็ด, ถั่งเช่าสีทอง, เส้นใย, เมล็ดธัญพืช

ABSTRACT

Mixture of nutrients was added to *Cordyceps militaris* culture media to stimulate mycelium growth and bioactive substances formation. This research was to find out a suitable nutrient source for *Cordyceps militaris* growth. The objective was to investigate the growth of *Cordyceps militaris* mycelium in various solid media, added with 8 different grain such as Jasmine rice, sticky rice, brown Jasmine rice, Riceberry rice, soybean, mung bean, corn and Job's tears. The result found that *Cordyceps militaris* mycelium cultivated on solid media filled with Riceberry rice had the highest growth at 18 days.

Keywords: mushroom, *Cordyceps militaris*, mycelium, grain

บทนำ

ถั่งเช่าสีทอง *(Cordyceps militaris)* เป็นเห็ดที่ทั่วโลกให้ความสนใจในการบริโภคเห็ดเป็นยา มีส่วนประกอบของสารอาหาร วิตามิน เกลือแร่ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น คอร์ไดซิปิน (cordycepin) และอะดีโนซิน (adenosine) ที่สูงกว่าถั่งเช่าแท้ (Auetragul, 2015) ทำให้นักวิจัยมีความพยายามหาวิธีกระตุ้นให้ถั่งเช่าสีทองเจริญและสร้างสารได้เร็วขึ้นในพื้นที่จำกัด โดยวิธีที่นำมาใช้คือ การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด (mycelium) ซึ่งยังคงให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญเช่นเดียวกับในดอกเห็ด แต่ใช้ระยะเวลาการเลี้ยงสั้นกว่า

อาหารเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองที่มีรายงานส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และมีแร่ธาตุบางชนิดที่ต้องการแตกต่างกันไป (Chang *et al.,* 2006) ที่มาของแหล่งคาร์บอนอาจเป็นทางเลือกสำคัญที่ควรศึกษาเพื่อรองรับการผลิตที่เพิ่มขึ้นในอนาคต และเนื่องจากประเทศไทยสามารถผลิตข้าวและธัญพืชได้มากมายหลายชนิด การนำเมล็ดธัญพืชซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูกมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงทดแทนสูตรอาหารเดิมที่ใช้มันฝรั่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเส้นใยถั่งเช่าสีทองโดยใช้เมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบทางเลือกและเพิ่มมูลค่าให้กับแหล่งอาหารเหล่านี้

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

1. เมล็ดธัญพืช 8 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวเหนียว ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวไรซ์เบอรี่ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด และลูกเดือย
2. สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง จากศูนย์อานนท์ไบโอเทค
3. มันฝรั่ง ข้าวโพดฝักอ่อน ผงวุ้น และสารอาหารต่างๆ ได้แก่ กลูโคส เปปโตน ยีสต์สกัด วิตามิน และแมกนีเซียมซัลเฟต

วิธีการทดลอง

นำธัญพืชทั้ง 8 ชนิด ชนิดละ 200 กรัม ล้างให้สะอาด แช่ในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของน้ำสกัดที่ได้มาเติมสารอาหาร กลูโคส เปปโตน ยีสต์สกัด วิตามิน แมกนีเซียมซัลเฟต และผงวุ้น (วิธีการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงและสัดส่วนสูตรอาหาร ศึกษาเพิ่มเติมได้จาก Noitup *et al.* (2018) อนุสิทธิบัตร “กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว” เลขที่คำขอ 1703001293) จากนั้นนำอาหารเพาะเลี้ยงไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทลงในจานเพาะเลี้ยงทิ้งให้เย็น

นำหัวเชื้อเส้นใยถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมาเจาะบริเวณรอบนอกสุดของโคโลนี ด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางหัวเชื้อเส้นใยบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เส้นใยสามารถเจริญได้ทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 22 ± 2 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเส้นใย โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 18 วัน

วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ เปรียบเทียบความแปรปรวนด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการติดตามการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของธัญพืช 8 ชนิด พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่ได้จากธัญพืชต่างชนิดกัน มีผลต่อการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ดังแสดงใน Table 1 พบว่า ในช่วง 3 วันแรก เส้นใยเห็ดยังมีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเมื่อมีอายุได้ 18 วัน โดยอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ข้าวไรซ์เบอรี่เป็นส่วนผสม มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ข้าวกล้องหอมมะลิ ถั่วเขียว ข้าวขาวหอมมะลิ ข้าวเหนียว ลูกเดือย มันฝรั่ง (control) ข้าวโพด และถั่วเหลือง ซึ่งเห็นได้ว่า ข้าวทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้ให้การเจริญของเส้นใยที่ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากทั้งข้าวและมันฝรั่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง (83.6 – 91.7 และ 85.0 %น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) มีสารอาหารที่เส้นใยถั่งเช่าสามารถนำไปใช้ได้ดี โดยเฉพาะข้าวไรซ์เบอรี่ที่อุดมไปด้วยสารอาหาร ในขณะที่ถั่วเหลืองให้การเจริญของเส้นใยต่ำสุด อาจเนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำสุด แต่มีไขมันสูงสุด (35.3 และ 21.0 %น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ทำให้ไม่เหมาะต่อการเจริญของเส้นใยถั่งเช่า

ส่วนความหนาแน่นของเส้นใยและสีของเส้นใยถั่งเช่าสีทองไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samerpitak *et al.* (2007) ที่พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดที่มีฟักทองเป็นวัตถุดิบซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก มีสารอาหารที่เชื้อราเห็ดสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี และงานวิจัยของ Khompan (2006) พบว่าจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี น้ำตาลกลูโคสเป็นสารอาหารที่สำคัญที่เชื้อเห็ดสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ทันที

Sornprasert *et al.* (2012) ศึกษาการเลี้ยงเส้นใย *Cordyceps militaris* (L.) Link BCC 18247 ด้วยเมล็ดข้าวในอาหารแข็ง พบว่า เมื่ออายุการเลี้ยง 15 วัน อาหารที่เตรียมจากข้าวกล้องมันปู ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวเหนียว กข 6 มีความหนาแน่นของเส้นใยในระดับหนาแน่นมาก ส่วนข้าวกล้องสีนิล ข้าวกล้องหอมมะลิ ข้าวกล้องหอมมะลิงอก ข้าวเหนียวดำ และข้าวเหนียวลืมผัว มีความหนาแน่นของเส้นใยในระดับปานกลาง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tapingkae *et al.* (2014) ที่เตรียมอาหารเพาะชนิดแข็งจาก ข้าวขาว ข้าวช้อมมือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวบาร์เลย์ และลูกเดือย เหมาะเป็นวัสดุเพาะถั่งเช่าสีทองมากกว่า ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วแดง และข้าวสาลี ในระยะเวลาการเพาะ 70 วัน

นอกจากนี้ เมื่อนำหัวเชื้อเส้นใยถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารจากข้าวไรซ์เบอรี่ 18 วัน นำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลวจากข้าวไรซ์เบอรี่ (อาหารสูตรเดิมแต่ไม่เติมผงวุ้น) 15 – 30 วัน และเปิดให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง 14 วัน เพื่อกระตุ้นให้เส้นใยสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า เส้นใยถั่งเช่าสีทองอบแห้งที่เลี้ยงจากข้าวไรซ์เบอรี่จากงานวิจัยนี้ มีปริมาณคอร์ไดซิปิน 4,252 – 5,596 มก./กก. และอะดีโนซิน 131.64 – 217.10 มก./กก. ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมถั่งเช่าที่จำหน่ายทางการค้า ที่มีคอร์ไดซิปิน 2,654 มก./กก. (Huang *et al*., 2009) และอะดีโนซิน 878.75 มก./กก. (Tapingkae *et al.,* 2014)

สรุป

จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองบนอาหารแข็งจากเมล็ดธัญพืชทั้ง 8 ชนิด พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของข้าวไรซ์เบอรี่ ให้การเจริญของเส้นใยถั่งเช่าสีทองได้ดีที่สุด ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 18 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจาก งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร สัญญาเลขที่ R2559 C160

เอกสารอ้างอิง

Auetragul, A. 2015. *Cordyceps.* In training document: Medicinal mushrooms, Anonbiotech, Pathum Thani, Thailand, Jul 25, 2015. (in Thai)

Chang, M.Y., G.J. Tsai, and J.Y. Houng. 2006. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. Enzyme Microb. Technol. 38: 407-414.

Huang, J. 2010. Safety assessment of the *Cordyceps militaris* fruit body. Toxicol. Lett., 196 suppl.: S332-S333.

Khompan, W. 2006. Selection of agricultural crops for production of fungal media. Available source: http://www.riclib.nrct.go.th/bookdetail.php (in Thai)

Noitup, P., P. Senanuch and J. Raknga n. 2018. Cultivation development of *Cordyceps mili taris* mycelium in liquid culture. Petty Patent request no. 1703001293. (in Thai)

Samerpitak, K., A. Kongthaworn, K. Trakarathai, K. Chaicumpar. 2007. Development of fungal media for using in laboratory learning. Srinagarind Med. J. 22 (4): 394 – 400. (in Thai)

Sornprasert, R., P. Saenkamon, C. Chanbamrung, M. Sanguankaew, and A. Hambananda. 2012. Cultivation of *Cordyceps militaris* (L.) Link BCC 18247 mycelium with different grains. Chandrakasem Rajabhat Univ. J. 18 (35): 83-91. (in Thai)

Tapingkae, T., M. Yachai, S. Sritiwong, K. Uponsril, A. Pornpannawich, A. Thongtub and W. Tapingkae. 2014. Study on cultivation and utilization of medicinal mushroom *Cordyceps militaris.* Research report, Chang Mai Rajabhat Univ., 157 pp. (in Thai)

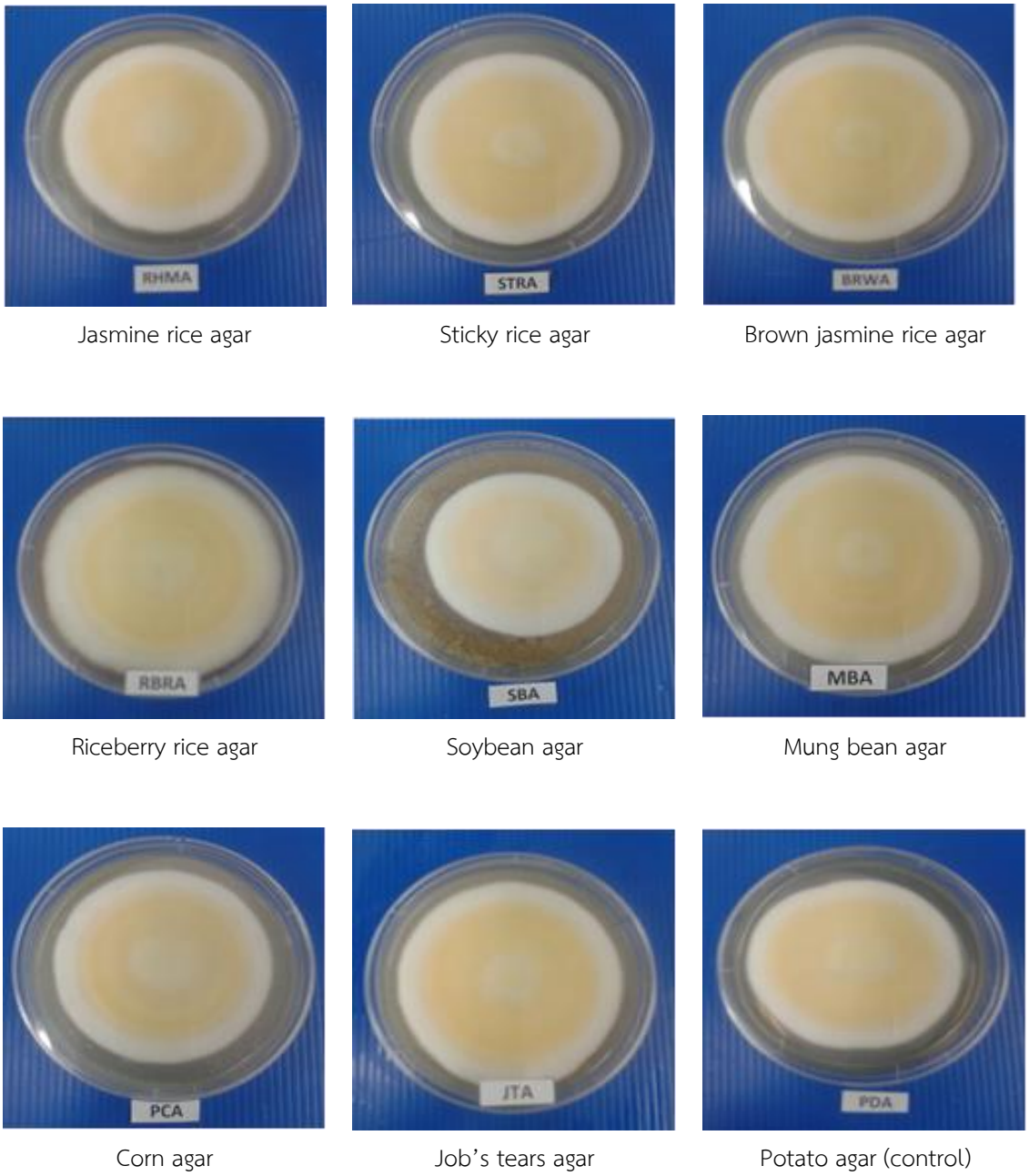

Figure 1 Morphology of *Cordyceps militaris* mycelium cultured for 18 days.

Table 1 Growth of *Cordyceps militaris* mycelium cultured for 18 days.

Type	Diameter (mm)						
	Day 0 ^{ns}	3 ^{ns}	6	9	12	15	18
Jasmine rice	0.6±0.00	10.0±0.15	22.2±0.30^{ab}	34.4±0.54^{ab}	47.4±0.87^{bc}	59.8±0.80^{b}	73.0±0.70^{bc}
Sticky rice	0.6 ±0.00	10.0±0.15	22.4±0.51^{ab}	35.2±0.48^{ab}	49.0±0.89^{ab}	59.8±0.44^{b}	73.0±0.87^{bc}
Brown jasmine rice	0.6±0.00	10.0±0.15	21.0±0.00^{bc}	35.4±0.54^{ab}	49.6±0.51^{ab}	60.0±0.34^{b}	75.0±0.00^{b}
Riceberry rice	0.6±0.00	10.0±0.15	23.4±0.89^{a}	36.0±0.23^{a}	51.2±0.20^{a}	65.8±0.30^{a}	83.4±0.77^{a}
Soybean	0.6±0.00	10.0±0.15	20.8±0.70^{bcd}	30.0±0.54^{c}	40.4±0.45^{d}	52.0±0.20^{d}	66.2±0.87^{d}
Mung bean	0.6±0.00	10.0±0.15	19.0±0.01^{d}	30.8±0.83^{c}	51.2±0.20^{a}	56.2±0.90^{c}	75.0±0.00^{b}
Corn	0.6±0.00	10.0±0.15	20.0±0.00^{cd}	33.0±0.41^{b}	44.6±0.47^{c}	56.0±0.70^{c}	69.6±0.54^{cd}
Job's tears	0.6±0.00	10.0±0.15	20.8±0.78^{bcd}	35.0±0.00^{ab}	49.8±0.28^{ab}	60.0±0.00^{b}	72.0±0.50^{bc}
Potato (control)	0.6±0.00	10.0±0.15	22.6±0.40^{ab}	34.6±0.50^{ab}	47.3±0.02^{ab}	55.4±0.19^{c}	70.8±0.30^{bcd}

Different superscript alphabets (a–d) in each column donate significant difference *($p<0.05$).*