

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกและคัดเลือกรเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase

ทำการแยกเชื้อราจากดินเจริญที่อุณหภูมิสูง และเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สามารถผลิต mannanase ได้ โดยแยกเชื้อรา จากตัวอย่างดิน จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่า มีเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 10 ไอโซเลต และเชื้อราที่สามารถผลิต mannanase ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งหมด 17 ไอโซเลต โดยเชื้อราที่เจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Thermophilic fungi) จำนวน 10 ไอโซเลต ให้ค่าการทำงานของ mannanase ตั้งแต่ 0.080 ถึง 0.781 U และค่า specific activity ตั้งแต่ 3.810 ถึง 27.214 U/mg สำหรับไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้แก่ เชื้อราจากตัวอย่างดินใน สวนลั่นทมอำเภอพร้าวกว้าง 4 ตัวอย่าง และเชื้อราจากตัวอย่างดินในสวนลำไยอำเภอพร้าวกว้าง 6 ตัวอย่าง ดังตาราง 1 สำหรับเชื้อราที่เจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Mesophilic fungi) จำนวน 17 ไอโซเลต ให้ค่าการทำงานของ mannanase ตั้งแต่ 0.027 ถึง 3.311 U และค่า specific activity ตั้งแต่ 0.871 ถึง 97.382 U/mg ดังตาราง 2 ไอโซเลตที่สามารถผลิต mannanase ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลต KM-1 มีการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity เท่ากับ 3.311 U และ 97.382 U/mg ตามลำดับ ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณน้ำตกผาตลาด ดอยสุเทพ ร่องลงมากือ ไอโซเลต KM-2 และ KM-6 ซึ่งให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 2.344 และ 2.905 U ตามลำดับ และค่า specific activity เท่ากับ 60.250 และ 64.694 U/mg ตามลำดับซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณสวนรุกขชาติ

ตาราง 1 เชื้อราไอโซเลตต่างๆ ที่ผลิต mannanase เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร cultivation ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	enzyme activity (U)	specific activity (U/mg)	แหล่งเก็บตัวอย่าง
11	0.781	19.525	สวนลีนจี อ.พริ้ว
12*	0.762	27.214	สวนลีนจี อ.พริ้ว
13	0.568	18.322	สวนรุกขชาติ
14	0.624	22.285	สวนรุกขชาติ
15	0.323	10.419	สวนสัตว์เชียงใหม่
16	0.307	15.350	สวนสัตว์เชียงใหม่
17	0.457	20.773	ศาลาอ่างแก้ว ม. เชียงใหม่
18	0.189	7.560	สวนสีก ม.เชียงใหม่
19	0.080	3.810	สวนสีก ม.เชียงใหม่
20	0.738	23.806	อุทยานกล้วยไม้ ม.แม่โจ้

หมายเหตุ : * ไอโซเลต ที่ enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

ตาราง 2 เชื้อราไอโซเลตต่างๆ ที่ผลิต mannanase เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร cultivation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลต	enzyme activity (U)	specific ctivity (U/mg)	แหล่งเก็บตัวอย่าง
KM-1	3.311	97.328	น้ำตกพาลาดคอยสุเทพ
KM-2	2.344	60.250	สวนรุกขชาติ
KM-5	0.994	24.850	สวนรุกขชาติ
KM-6	2.905	64.694	สวนรุกขชาติ
KM-7	0.027	0.871	ศาลาอ่างแก้ว ม.เชียงใหม่
KM-8	0.767	26.448	น้ำตกห้วยแก้ว
KM-9	-0.788	-24.625	น้ำตกห้วยแก้ว
KM-10	-0.878	-28.322	ผาดำคอยปุย
KM-11	0.761	23.060	ผาดำคอยปุย
KM-12	2.317	58.147	ผาดำคอยปุย
KM-13	-0.978	-30.562	สวนสน คอยสุเทพ
KM-14	-0.678	-21.871	สวนสน คอยสุเทพ
KM-15	-1.322	-41.312	ผาเงิบ คอยสุเทพ
KM-16	1.300	41.935	ผาเงิบ คอยสุเทพ
KM-17	-0.878	-30.275	สวนสัตว์เชียงใหม่
KM-18	-1.133	-40.464	สวนสัตว์เชียงใหม่
KM-19	1.028	34.267	สวนสัตว์เชียงใหม่

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อราไอโซเลต KM-1

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต KM-1 โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA และเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 27 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออายุยังน้อยพบว่าเชื้อรามีเส้นใยสีขาวและเมื่อเชื้อราอายุมากขึ้น เส้นใยมีสีเหลืองไม่ฟูมากลักษณะผิวโคโลนีไม่เป็นมัน มักพบก้อนสีน้ำตาลติดอยู่บนผิวของโคโลนี ดังภาพ 7 เส้นใยมีการเจริญออกเป็นวงกลม ถ้าทิ้งไว้นานประมาณ 2 อาทิตย์ จะพบว่าเส้นใยมีสีน้ำตาลอ่อน จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาด $\times 10$ พบ ascocarp มีลักษณะกลมแบบ cleistothecium เมื่อใช้แรงกดลงบนสเปร์จะเห็น ascus หลายอัน (asci) อยู่เป็นกลุ่ม รูปร่างเหมือนถุงยาวกระจายอยู่ทั่วไป ภายใน ascus ประกอบด้วย ascospore ซึ่งมีลักษณะกลม หรือรูปกระสวย ผนัง ascocarp เป็นแบบเส้นใยประสานกัน (interwoven hyphae) ดังภาพ 8 ซึ่งจัดเป็นระยะ perfect stage ใน Family Eurotiaceae โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้ ในระยะ perfect stage มีการสร้าง ascogonium ซึ่งแตกมาจาก somatic hypha มีหลาย nuclei antheridium ที่มาผสม พันกันเป็นเกลียวโดยรอบผนังที่สัมผัสกันจะสลายตัว nucleus จาก antheridium เคลื่อนเข้าสู่ ascogonium แล้วส่ง nuclei เข้าจับคู่กันได้ ลักษณะ dikaryon ($n+n$) ต่อมาจะมี septum มากขึ้นแต่ละเซลล์เป็น dikaryotic cell ($n+n$) มี sterile hypha ขึ้นมาปกคลุมกลายเป็น ascocarp ในที่สุด แต่ละ disk cell พบว่าแต่ละเซลล์เป็น $n+n$ จะมีการงอก hypha ออกไป หลังจากงอก hypha nucleus ทั้งสองเคลื่อนเข้ามาแล้วมีการแบ่งตัวแบบ mitosis หลายครั้ง แล้วยังจับตัวเป็นคู่ ๆ โดยมี septum แบ่งเป็นเซลล์ hypha นี้เรียก ascogenous hypha ต่อมาหลุดออกเป็นเซลล์ ๆ แล้วมีการผสมกันของ nucleus ได้ $2n$ ติดตามด้วยการแบ่งตัวแบบ meiosis และ mitosis อีก 1 ครั้ง ได้ 8 nuclei เซลล์จะพองขึ้นกลายเป็น ascus ห่อหุ้ม ascospore ไว้ เมื่อ ascus แก่ผนังเซลล์จะสลายออก เรียก deliquesce ทำให้ ascospore หลุดออกไป ผนัง ascocarp เป็น mycelium มาพันตัวกัน ภายในมี ascus มากมาย กระจายอยู่ทั่วไป อาจพบ ascogenous hypha ซึ่งเหลืออยู่ (อ้างโดย นิวัฒน์, 2526)

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ที่กล่าวไว้ข้างต้น พบว่าเชื้อราไอโซเลต KM-1 ที่แยกได้จากดินบริเวณผาลาด ดอยสุเทพ เป็นเชื้อรา *Talaromyces* (from-genus *Penicillium*) (Domsch, 1980 ; Von Arx, 1981) เมื่อจัดลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานตามแบบของ Ainsworth (1971, 1973) (อ้างโดย นิวัฒน์, 2526) สามารถจัดได้ดังนี้ คือ

Penicillium) (Domsch, 1980 ; Von Arx, 1981) เมื่อจัดลำดับขั้นทางอนุกรมวิธานตามแบบของ Ainsworth (1971, 1973) (อ้างโดย นิวัฒน์, 2526) สามารถจัดได้ดังนี้ คือ

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Sub-division Ascomycotena

Class Plectomycetes

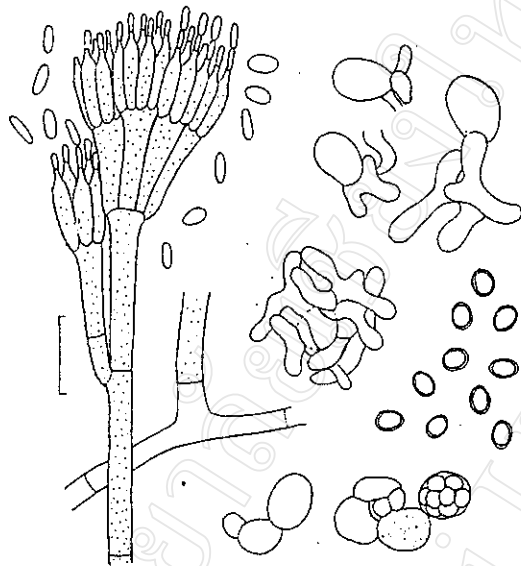
Order Eurotiales

Family Eurotiaceae

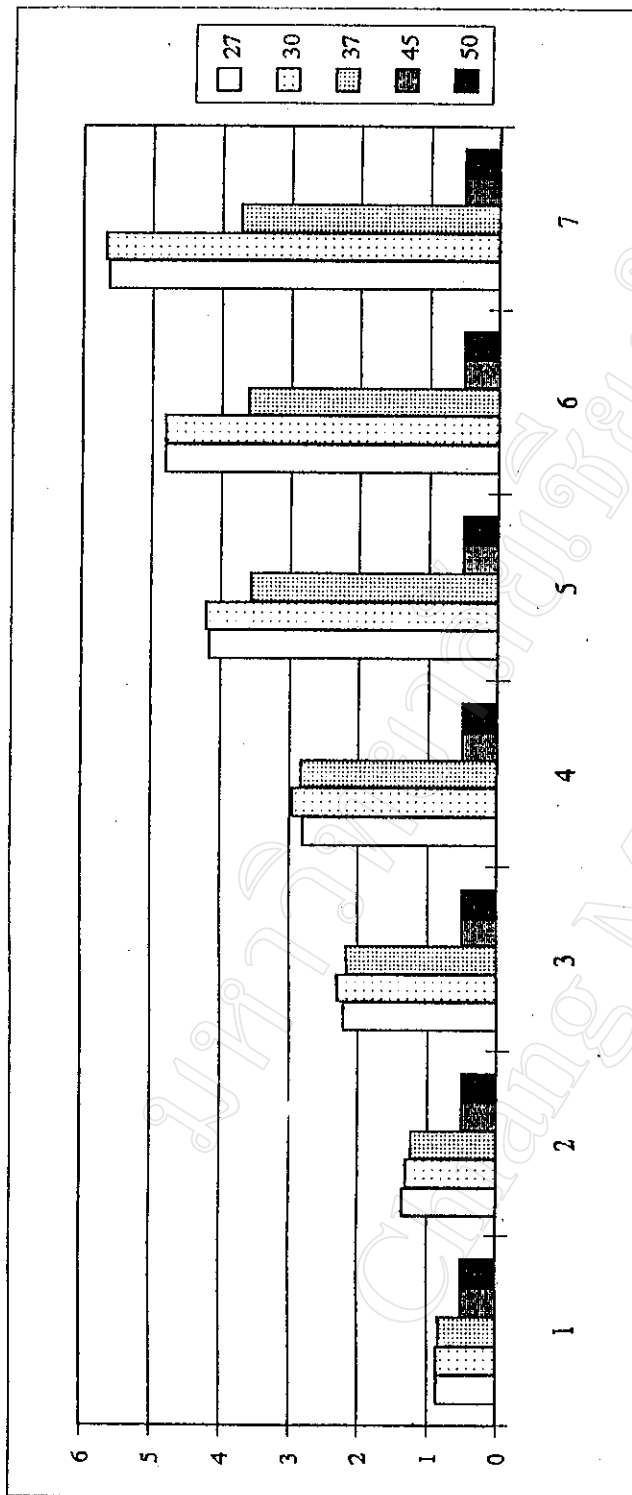
Genus *Talaromyces* (form-genus *Penicillium*)



ภาพ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Talaromyces* sp. ที่เจริญบนอาหาร PDA



ภาพ 8 ลักษณะ ascocarp แบบ cleistothecium ภายใน ascus ประกอบด้วย
ascospore



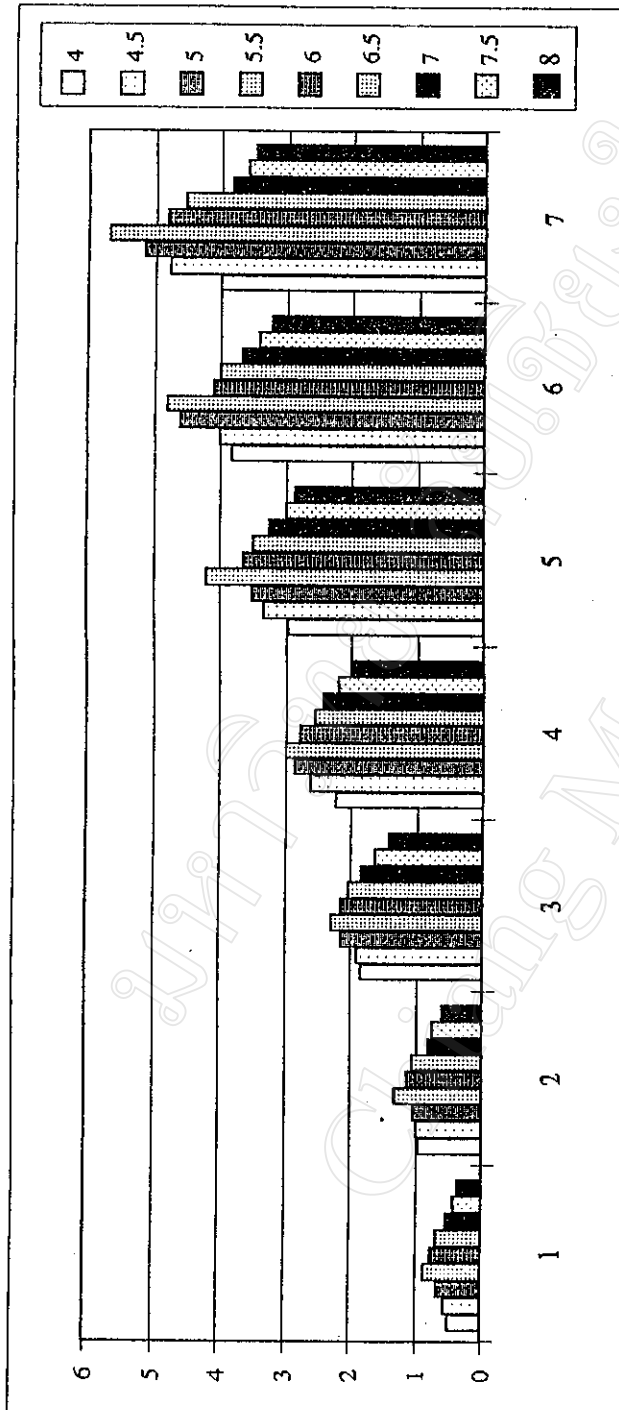
ภาพ 9 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1 บนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7

4. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1 ที่มีค่าความเป็นกรดต่างของอาหารแข็ง PDA แตกต่างกัน ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 วางแผน การทดลองละ 3 ซ้ำ โดยใช้อาหาร PDA เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในแต่ละ pH ของอาหาร และแต่ละวันพบว่า ที่ pH 5.0 ถึง 6.0 เชื้อรามีการเจริญได้ดี โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) เท่ากับ 5.15 ถึง 4.82 ตามลำดับ เชื้อรามีการเจริญได้น้อยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) เท่ากับ 4.00 ถึง 4.76 ตามลำดับ ในอาหาร PDA ที่ pH 4.0-4.5 และ pH 7.0-8.0 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) เท่ากับ 3.84 ถึง 3.48 ตามลำดับ ดังตาราง 4 และภาพ 10

ตาราง 4 ผลการเจริญเฉลี่ยของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1 บนอาหารแข็ง PDA ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหารแตกต่างกัน จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7

วันที่ pH	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)						
	1	2	3	4	5	6	7
4.0	0.48	0.96	1.84	2.22	2.96	3.82	4.00
4.5	0.56	1.00	1.90	2.62	3.34	4.00	4.76
5.0	0.66	1.04	2.14	2.86	3.52	4.60	5.15
5.5	0.86	1.32	2.30	3.00	4.20	4.80	5.68
6.0	0.76	1.14	2.14	2.78	3.64	4.10	4.82
6.5	0.68	1.06	2.04	2.56	3.50	4.00	4.54
7.0	0.54	0.82	1.84	2.42	3.26	3.68	3.84
7.5	0.42	0.74	1.62	2.20	3.00	3.42	3.60
8.0	0.36	0.60	1.42	2.00	2.86	3.22	3.48



ภาพ 10 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1 บนอาหารแข็ง PDA ที่ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารแตกต่างกัน จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 7

5. ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิต mannanase โดยใช้อาหาร เหลวดังภาคผนวก ก. ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกันคือ 1 % (w/v) ของแป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง แป้งบุกเมืองกาญจน์ บุกจากเพชรบูรณ์ แป้งบุกญี่ปุ่น (konjac mannan) locust bean gum กลูโคสและแมนโนสทำการเพาะเลี้ยงห้วเชื้อในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานสารละลาย mannose และ bovine serum albumin พบว่า มีการผลิตเอนไซม์จาก locust bean gum แป้งบุกญี่ปุ่น และแมนโนส แหล่งคาร์บอนอื่นได้แก่ แป้งละลายน้ำได้ แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง แป้งบุกเมืองกาญจน์ บุกจากเพชรบูรณ์ และกลูโคส พบว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา การใช้ locust bean gum ให้ค่าการทำงานและ specific activity ของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 3.311 U และ 103.469 U/mg ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนที่ให้การทำงานรองลงมาคือ แป้งบุกญี่ปุ่นและ แมนโนส มีค่าการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 2.539 และ 0.267 U และค่า specific activity เท่ากับ 61.927 และ 11.125 U/mg ตามลำดับ ดังตาราง 5 และภาพ 11

6. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ locust bean gum ต่อการผลิต mannanase โดย เชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

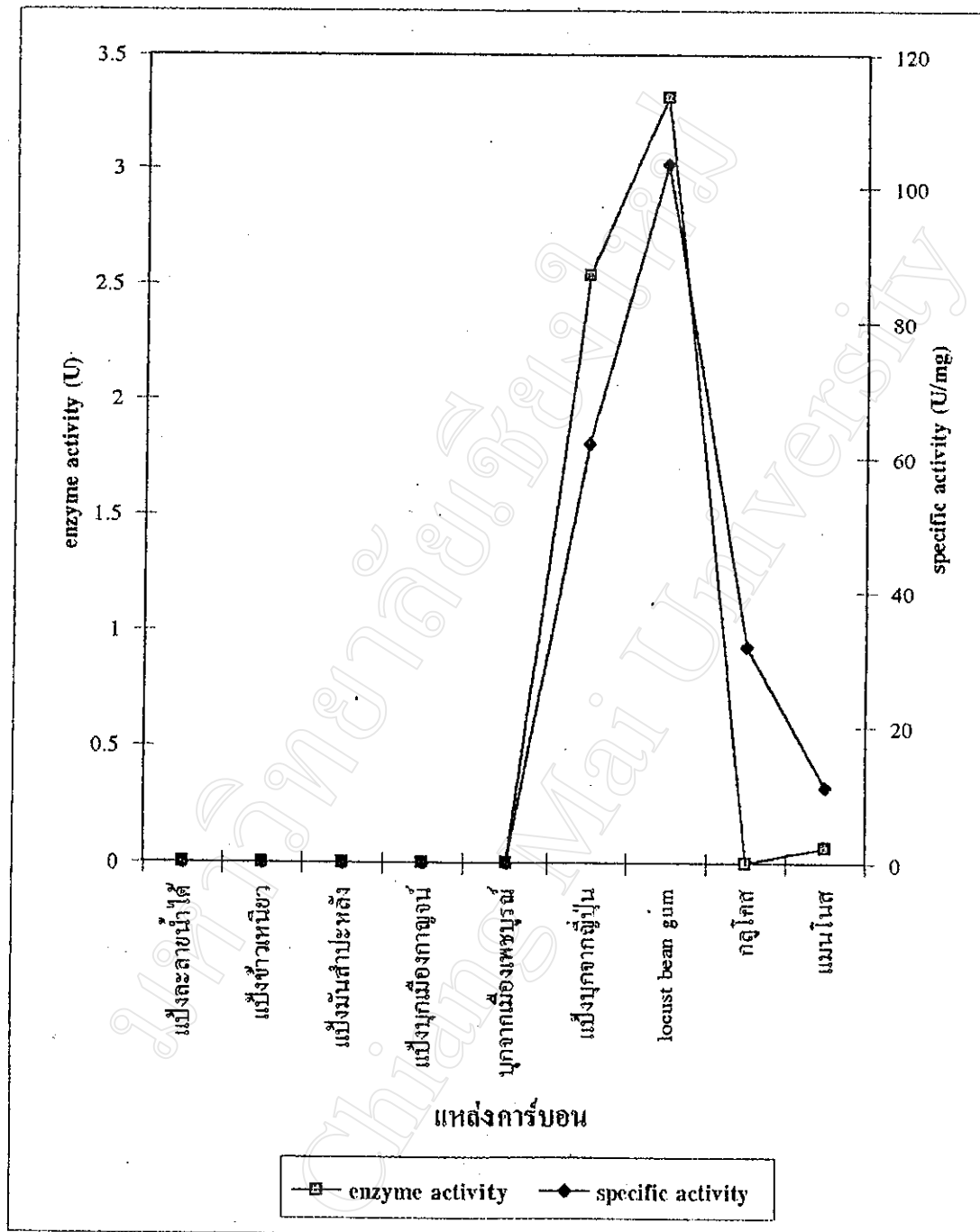
จากการศึกษาความเข้มข้นของ locust bean gum โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานสารละลาย mannose และ bovine serum albumin เมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์กับความเข้มข้นของ locust bean gum พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5 % (w/v) locust bean gum ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 8.889 U เมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity กับความเข้มข้นของ locust bean gum พบว่าที่ 1.5 % locust bean gum ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 306.517 U/mg ดังนั้น locust bean gum ที่ความเข้มข้น 1.5%(w/v) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต mannanase

ตาราง 5 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและ specific activity ที่ได้จากอาหาร
 เหลวที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 9 ชนิด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม
 เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH5.5 เป็นเวลา 20 นาที ของเชื้อรา
Talaromyces sp. KM-1

แหล่งคาร์บอน	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
แป้งละลายน้ำได้	-1.944	0.017	-114.353
แป้งข้าวเหนียว	-1.511	0.017	-88.882
แป้งมันสำปะหลัง	-2.317	0.024	-96.542
แป้งบุกเมืองกาญจน์	-1.194	0.028	-42.643
บุกจากเพชรบูรณ์	-0.855	0.035	-24.428
แป้งบุกจากญี่ปุ่น	2.539	1.041	61.927
locust bean gum	3.311	0.032	103.469
กลูโคส	-0.794	0.025	-31.760
แมนโนส	0.267	0.024	11.125

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

มากที่สุด และเมื่อความเข้มข้นของ locust bean gum เพิ่มขึ้นจาก 1.5 % ขึ้นไปจนถึง 3 % พบว่า
 การทำงานของเอนไซม์จะลดลงมาก โดยลดลงจาก 8.889 เป็น 2.289 U และการลดความเข้มข้น
 ของ locust bean gum ตั้งแต่ 1 % จนถึงไม่มีการเติม locust bean gum ลงในอาหารเหลว พบว่า
 การทำงานของเอนไซม์จะลดลงจาก 7.561 เป็น 2.289 U ตามลำดับ ดังตาราง 6 และภาพ 12



ภาพ 11 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลือที่มี แหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 9 ชนิด

ตาราง 6 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ specific activity ที่ได้จาก อาหาร
 เหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มีความเข้มข้นของ locust bean gum แตกต่างกันไปเฉพาะ
 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50
 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

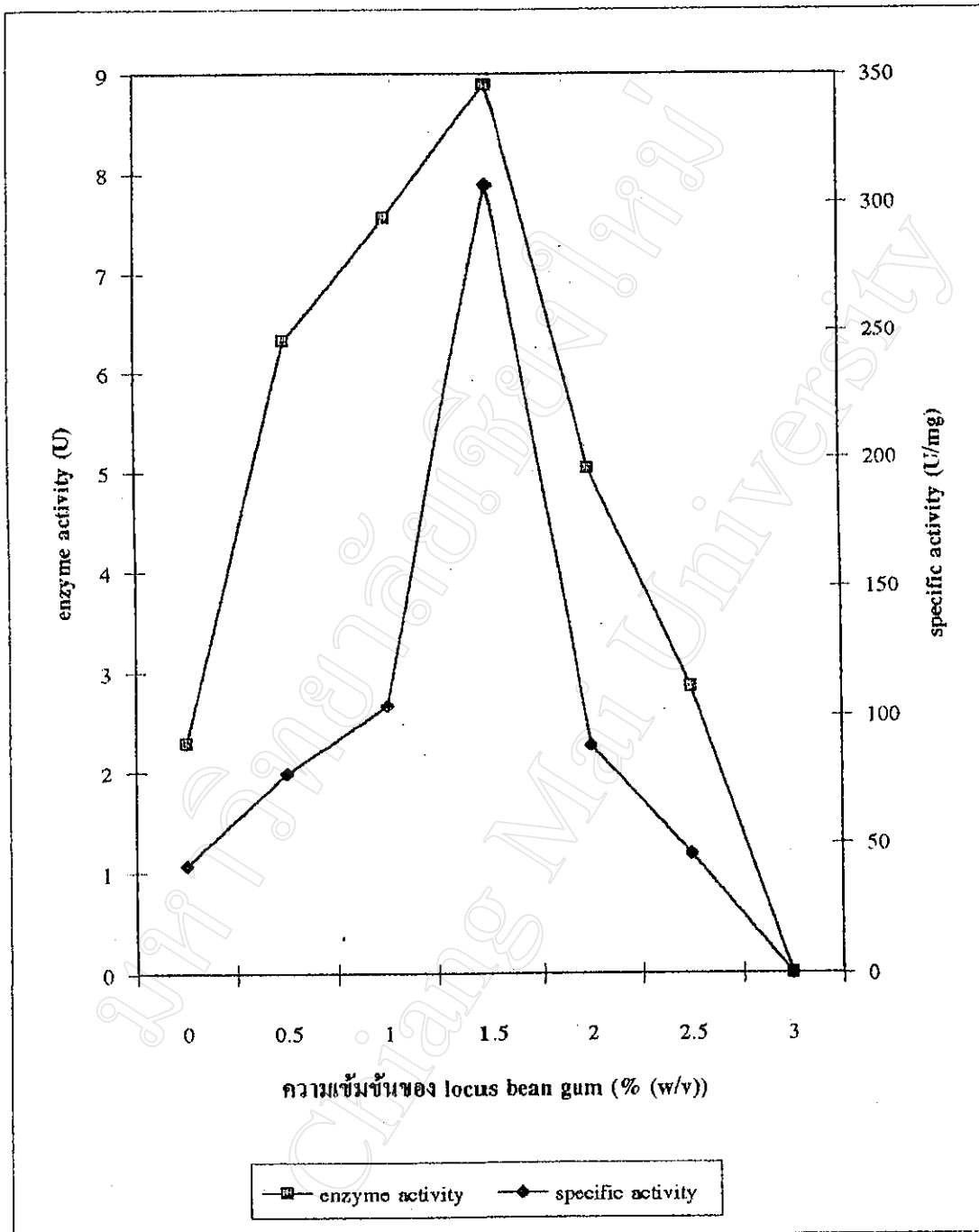
ความเข้มข้นของ locust bean gum (% (w/v))	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
0 (ชุดควบคุม)	2.289	0.055	41.618
0.5	6.317	0.082	77.036
1.	7.561	0.073	103.575
1.5	8.889	0.029	306.517
2	5.028	0.057	88.210
2.5	2.844	0.062	45.870
3	-0.305	0.054	-5.648

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

7. ผลการศึกษา ความเป็นกรด ต่างของอาหารเหลวต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

จากการศึกษาค่าของความเป็นกรดต่างของอาหารเหลวที่มีผลต่อการผลิต mannanase
 ของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase (CM) (ดัง
 ภาคผนวก ข) กำหนดใช้ 1.5 % (w/v) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ค่า pH แตกต่างกัน
 ก็คือ 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



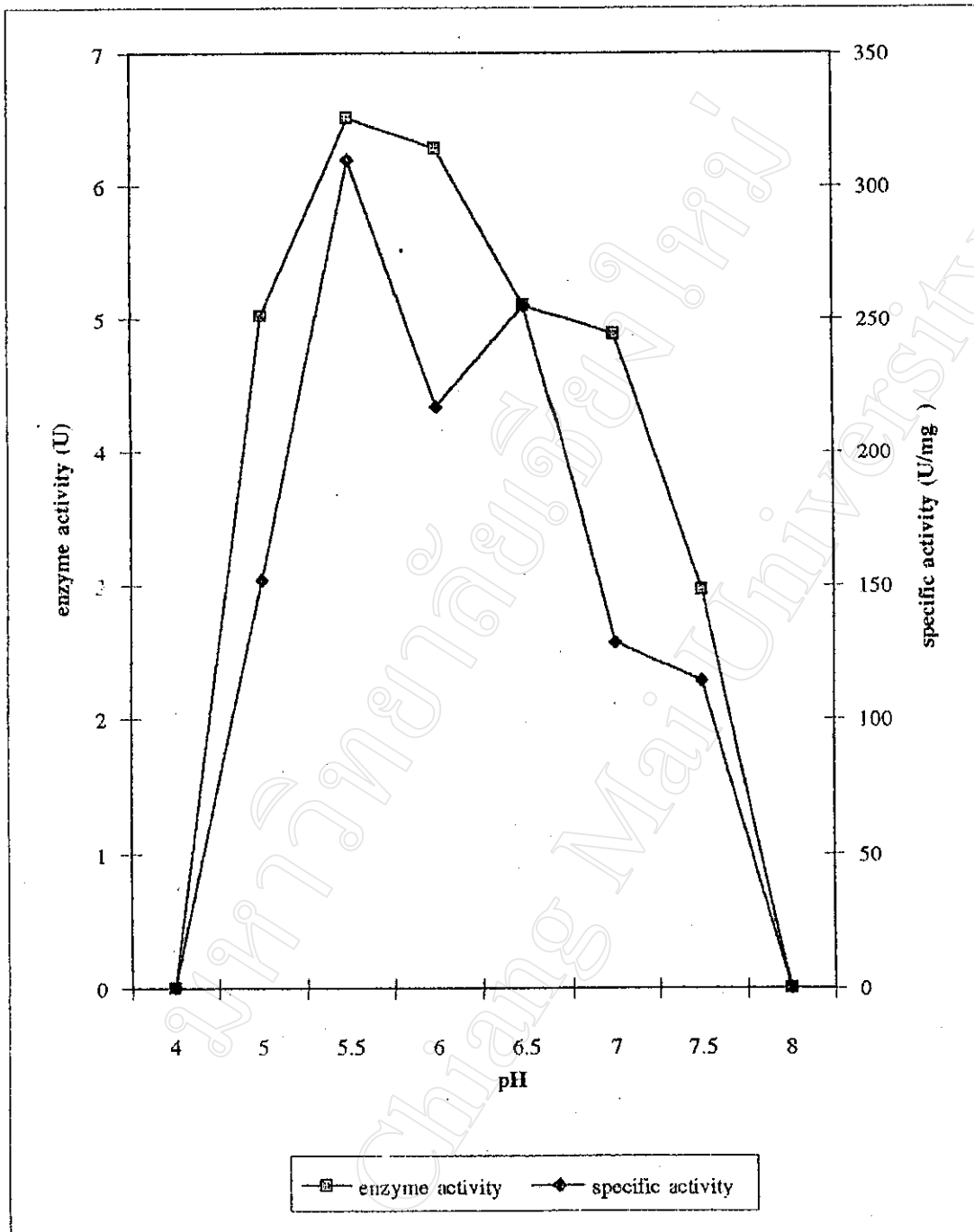
ภาพ 12 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลว
เพื่อผลิต mannanase ที่มีความเข้มข้นของ locus bean gum แตกต่างกัน

และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์กับ pH แตกต่างกันของอาหารเหลว CM พบว่า ที่ pH 5.5 ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 6.505 U เมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity กับ pH แตกต่างกันของอาหารเหลว พบว่า ที่ pH 5.5 ให้ผลดีที่สุด เท่ากับ 309.762 U/mg ดังนั้น ที่ pH 5.5 เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิต mannanase มากที่สุด เมื่อ pH ของอาหารเหลวลดลงจาก 5.5 ถึง 4.0 พบว่า การทำงานของเอนไซม์จะลดลงมาก โดยลดลงจาก 6.505 เป็น -0.705 U และเมื่อ pH ของอาหารเหลวเพิ่มขึ้นจาก 5.5 ถึง 6.5 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ค่อย ๆ ลดลง จาก 6.505 เป็น 5.100 U และจะลดลงมาก จาก 4.878 เป็น -0.961 U เมื่อ pH เพิ่มขึ้นจาก 7.0 ถึง 8.0 ดังตาราง 7 และภาพ 13

ตาราง 7 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและ specific activity ที่ได้จาก อาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มีความเป็นกรดต่างของอาหารเหลวแตกต่างกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ของ เชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

ค่า pH ของอาหารเหลว	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	ปริมาณโปรตีน (U/mg)
4	-0.705	0.034	-20.735
5	5.017	0.033	152.030
5.5*	6.505	0.021	309.762
6	6.283	0.029	216.655
6.5	5.100	0.020	255.00
7	4.878	0.038	128.368
7.5	2.967	0.026	114.115
8	-0.961	0.052	-18.481

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด



ภาพ 13 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ที่มีความเป็นกรดต่างของอาหารเหลวแตกต่างกัน

8. ผลการศึกษา แหล่งไนโตรเจนต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิต mannanase โดยเตรียมอาหารเหลว ดังภาคผนวก ก. มี 1 % (w/v) ของ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ 0.2 % yeast extract, 0.2 % soy bean meal, 0.2 % urea, 0.2 % peptone และ 0.1 % corn steep solids ร่วมกับ 0.2 % NaNO_3 ทำการเพาะเลี้ยงห้วเชื้อในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานสารละลาย mannose และสารละลาย BSA พบว่ามีการผลิตเอนไซม์จาก corn steep solids กับ NaNO_3 yeast extract soy bean meal และ peptone โดยให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.811, 1.722, 1.272 และ 0.028 U ตามลำดับ และ specific activity เท่ากับ 103.00, 57.400, 36.343 และ 0.583 U/mg ตามลำดับ ไม่พบการผลิตเอนไซม์จาก urea การใช้ 0.1 % corn steep solids กับ 0.2 % NaNO_3 ให้ค่าการทำงานและ specific activity สูงสุดเท่ากับ 3.811 U และ 103.000 U/mg ตามลำดับ ดังตาราง 8 และภาพ 14

9. ผลการศึกษา NaNO_3 และ corn steep solids ต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

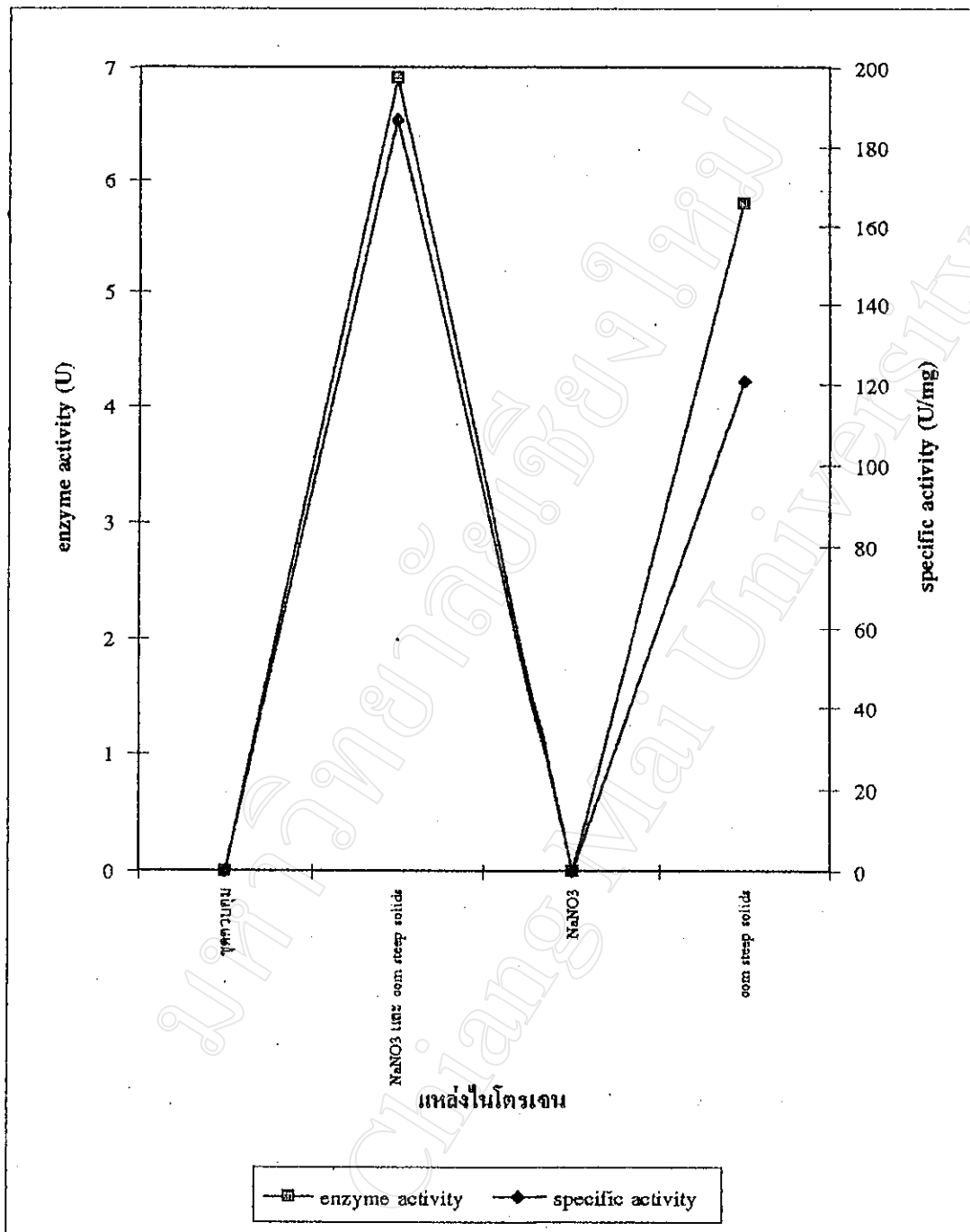
จากการศึกษาผลของ 0.2% NaNO_3 และ 0.1% corn steep solids ที่มีผลต่อการผลิต mannanase โดยเตรียมอาหารเหลว ดังภาคผนวก ก. มี 1 % (w/v) ของ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ดังนี้คือ 0.2 % NaNO_3 , 0.1 % corn steep solids, 0.2 % NaNO_3 กับ 0.1% corn steep solids และชุดควบคุมที่ไม่มีทั้ง NaNO_3 และ corn steep solids ทำการเพาะเลี้ยงห้วเชื้อในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่า มีการผลิตเอนไซม์จาก NaNO_3 ร่วมกับ corn steep solids และ corn steep solids อย่างเดียว ไม่พบการผลิต

ตาราง 8 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ specific activity ที่ได้ จากอาหารเหลว ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 6 ชนิดเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาทีของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

แหล่งไนโตรเจน	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	ปริมาณโปรตีน (U/mg)
ไม่มีแหล่งไนโตรเจน	-0.267	0.029	-9.207
yeast extract	1.722	0.030	57.400
soy bean meal	1.272	0.035	36.343
urea	-0.211	0.034	-6.206
peptone	0.028	0.048	0.583
corn steep solids*	3.811	0.037	103.000
NaNO ₃			

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

เอนไซม์จาก NaNO₃ และชุดควบคุม การเติม 0.2 % NaNO₃ กับ 0.1 % corn steep solids ลงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุด เท่ากับ 6.905 U และ specific activity ดีที่สุด เท่ากับ 186.622 U/mg ส่วนการเติม 0.1% corn steep solids ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์และ specific activity เท่ากับ 5.800 U และ 120.833 U/mg ดังตาราง 9 และภาพ 15

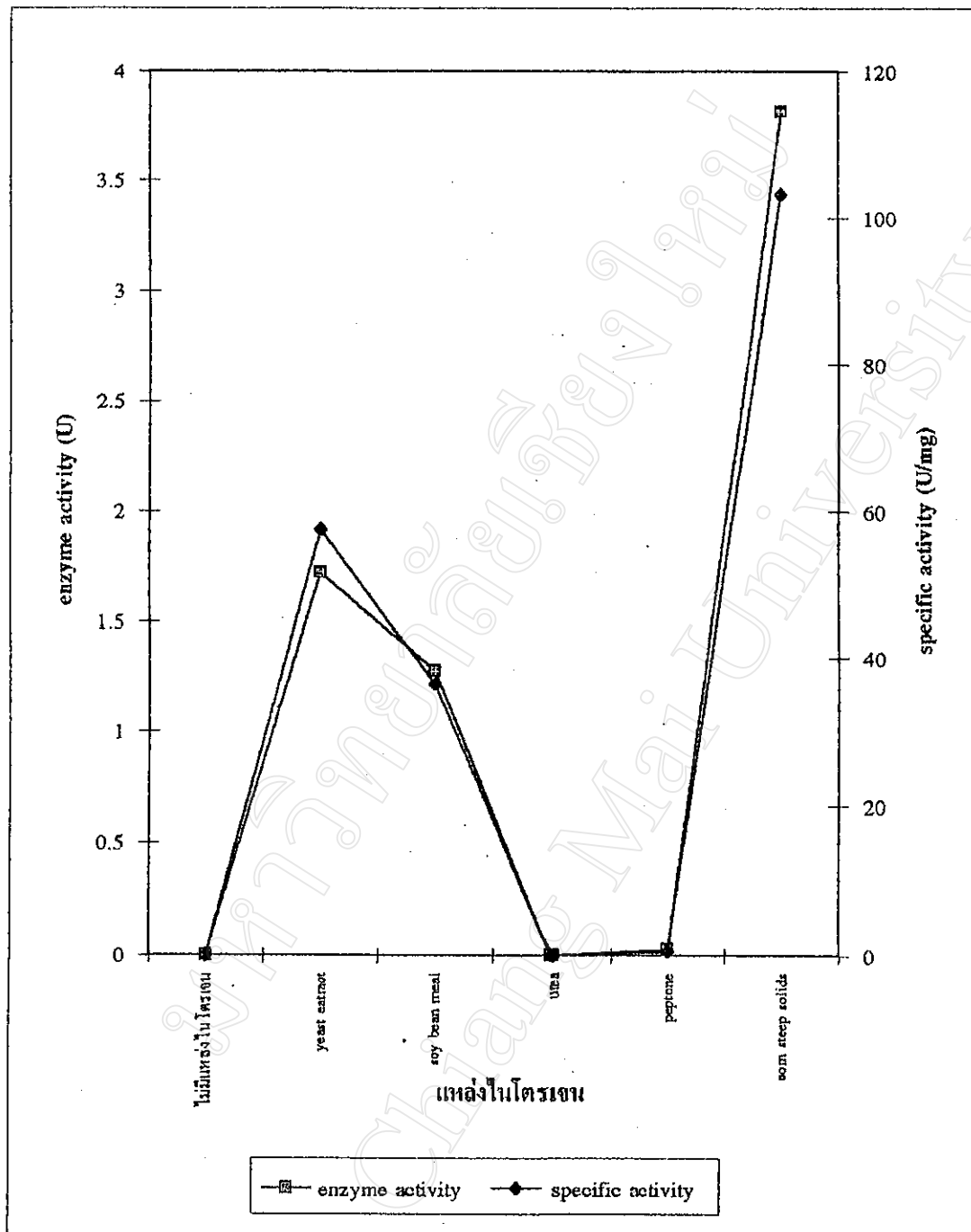


ภาพ 14 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลือ
ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 6 ชนิด

ตาราง 9 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ specific activity ที่ได้จากการเติม NaNO_3 และ corn steep solids ลงในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที ของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

แหล่งไนโตรเจน	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	ปริมาณโปรตีน (U/mg)
ชุดควบคุมไม่เติม NaNO_3 และ corn steep solids	-0.267	0.029	-9.207
NaNO_3 และ corn steep solids*	6.905	0.037	186.622
NaNO_3	-2.767	0.025	-110.680
corn steep solids	0.048	0.048	120.833

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด



ภาพ 15 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากการเติม NaNO_3 และ com steep solids ลงในอาหารเหลว

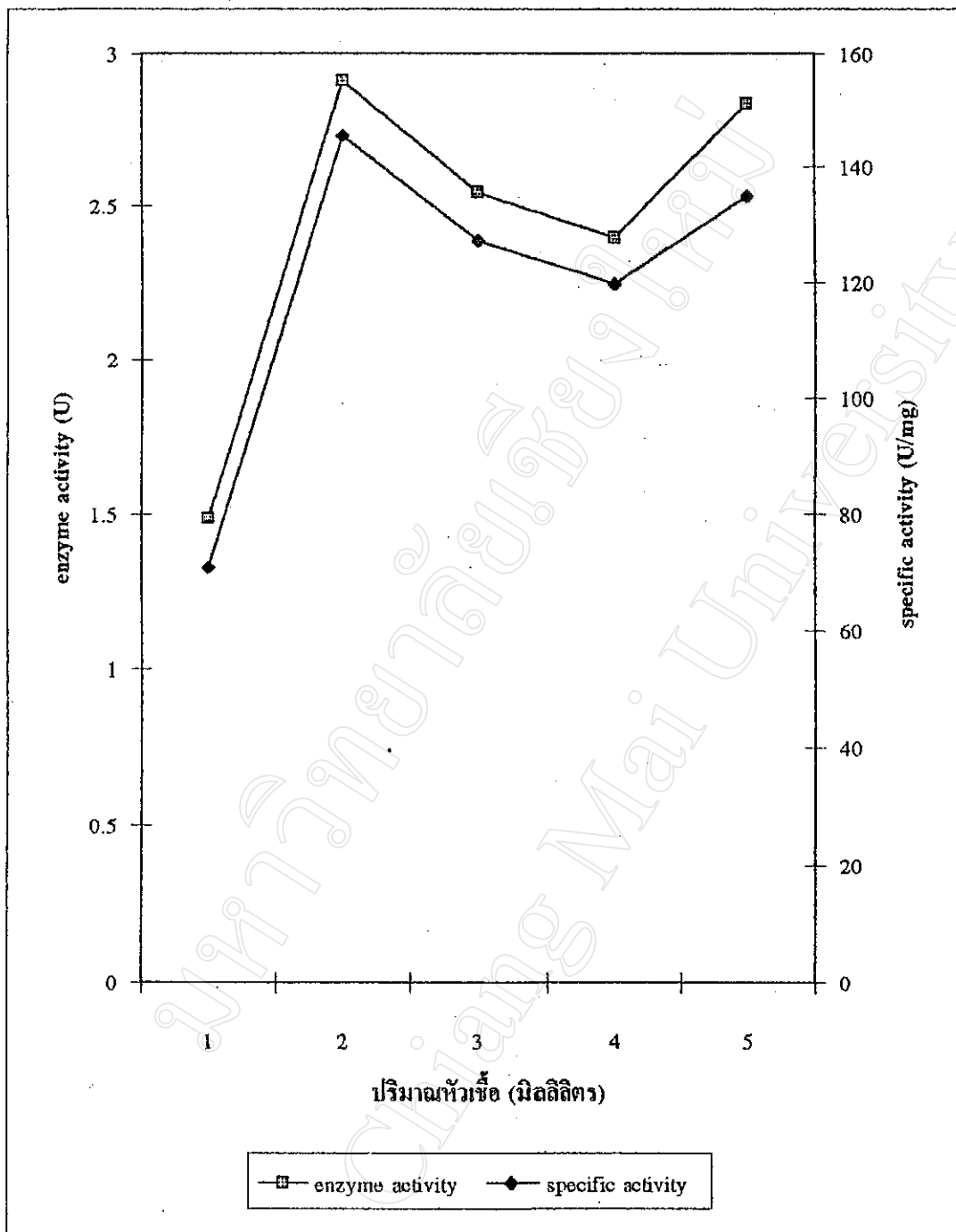
10. ผลการศึกษา ปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิต mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

จากการศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อต่อการผลิต mannanase โดยเตรียมอาหารเหลว เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อรา (enrichment media) (ดังภาคผนวก ก.) นำหัวเชื้อจาก seed culture ใน ปริมาณแตกต่างกัน คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ ใช้ 1.5 % (w/v) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 20 นาที และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อจาก seed culture ตั้งแต่ 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ให้ผลการทำงานของเอนไซม์ดี โดยให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เป็น 2.911, 2.544, 2.394 และ 2.833 U ตามลำดับ ปริมาณหัวเชื้อจาก seed culture ที่เหมาะสม ต่อการผลิต mannanase มากที่สุด คือ 2 มิลลิลิตร หรือ 4 % เนื่องจากใช้ปริมาณหัวเชื้อจำนวน น้อยแต่ให้ผลผลิตและการทำงานของเอนไซม์และ specific activity สูงสุดเท่ากับ 2.911 U และ 145.550 U/mg ดังตาราง 10 และภาพ 16

ตาราง 10 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ซึ่งมีปริมาณหัวเชื้อแตกต่างกัน ที่มี 1.5 % (w/v) ของ locust bean gum เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5

ปริมาณหัวเชื้อ (มิลลิลิตร)	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml. เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
1	1.483	0.021	70.619
2*	2.911	0.020	145.550
3	2.544	0.020	127.200
4	2.394	0.020	119.700
5	2.833	0.021	134.905

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด



ภาพ 16 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ที่ได้จากอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ซึ่งมีปริมาณหัวเชื้อแตกต่างกัน ที่มี 1.5% (w/v) ของ locust bean gum

11. ผลการศึกษา ความเป็นกรด ต่าง ต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา

Talaromyces sp. KM-1

จากการศึกษาผลของกรด ต่าง ต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้อาหารเหลวที่มี locust bean gum 1.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ 0.1 M acetate buffer pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, และ 5.5 ที่ 0.1 M phosphate buffer pH 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ เป็นเวลา 20 นาที วัดการทำงานของเอนไซม์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์กับ pH ของ 0.1 M acetate buffer และ ค่า specific activity กับ pH ของ 0.1 M acetate buffer พบว่า ที่ pH 5.5 ให้ผลดีที่สุด โดยมีการทำงานของเอนไซม์ เท่ากับ 6.572 U และ 312.952 U/mg ตามลำดับ ดังนั้น pH 5.5 เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase มากที่สุด เมื่อ pH ลดลงจาก 5.5 ถึง 4.0 ค่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงมากจนกระทั่งไม่มีการทำงานของเอนไซม์ เมื่อ pH เท่ากับ 3.0 และเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจาก 5.5 ถึง 7.5 ค่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงไปด้วยเช่นกัน จาก 6.572 เป็น 2.083 U ดังตาราง 11 และภาพ 17

12. ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp. KM-1*

จากการศึกษาระยะเวลาต่อการทำงานของ mannanase โดยใช้ 1% (w/v) locust bean gum pH ของอาหารเหลว 5.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แตกต่างกันคือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ตามลำดับ วัดการทำงานของเอนไซม์โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์กับระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่า ที่ระยะเวลา 15, 20 และ 25 นาที ให้ผลดี เท่ากับ 9.126, 6.367 และ 4.649 U ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า specific activity กับระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่า ที่ระยะเวลา 15, 20 และ 25 นาที ให้ผลดี เท่ากับ 434.562, 303.174 และ 221.376 U/mg ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์นาน 15 นาที เหมาะสมต่อการทำงานของ mannanase มากที่สุด ดังตาราง 12 และภาพ 18

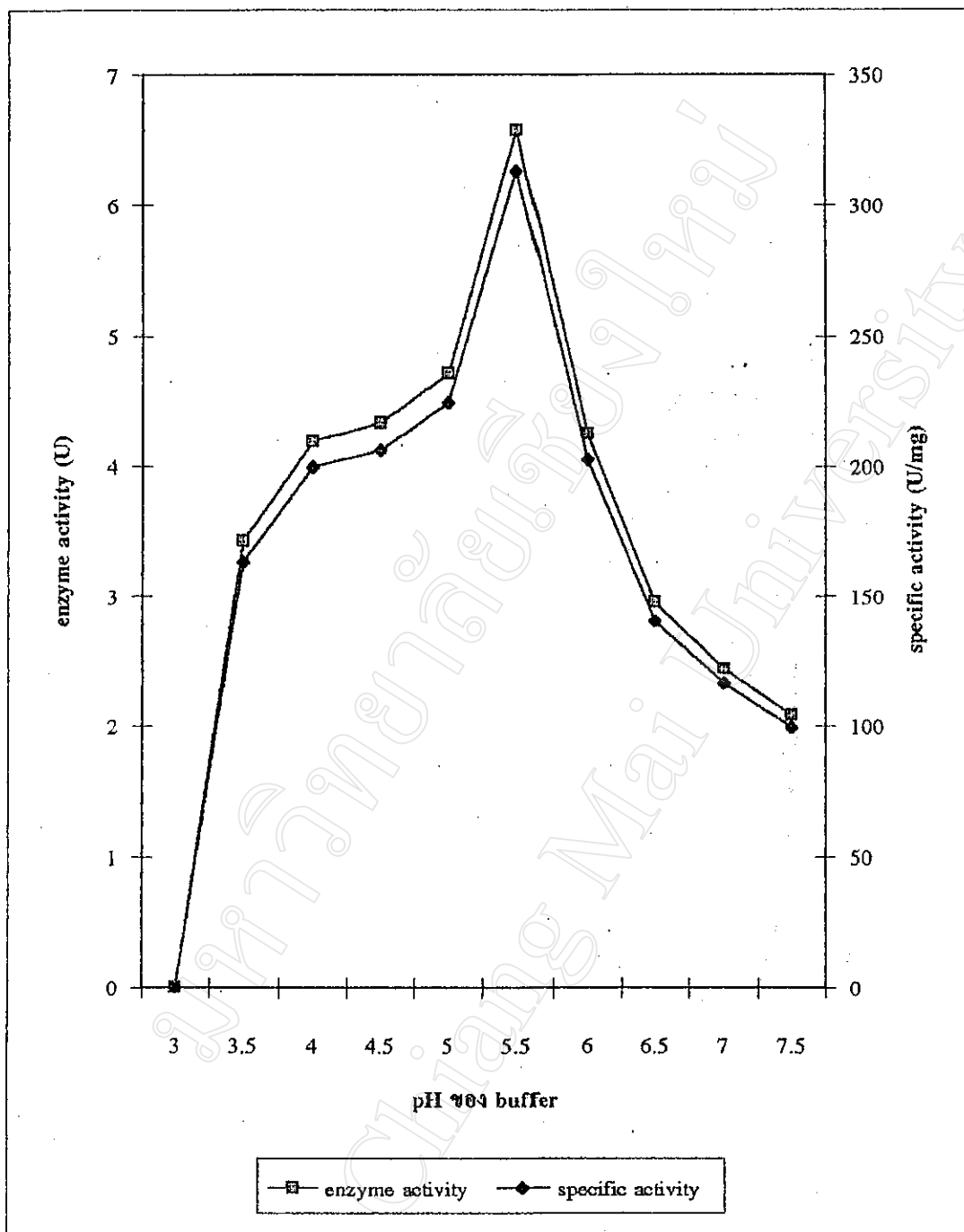
ตาราง 11 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและ specific activity ของอาหารเหลวที่มี locust bean gum 1.5 % (w/v) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH แตกต่างกันของ 0.1 M acetate buffer และ 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 20 นาที ของเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

pH ของ buffer	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
3	-0.505	0.021	-24.048
3.5	3.428	0.021	163.238
4	4.194	0.021	199.714
4.5	4.333	0.021	206.333
5	4.711	0.021	224.333
5.5*	6.572	0.021	312.952
6	4.255	0.021	202.619
6.5	2.950	0.021	140.476
7	2.440	0.021	116.381
7.5	2.083	0.021	99.190

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

13. ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces sp.* KM-1

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ mannanase โดยใช้อาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ที่มี 1. % (w/v) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน pH 5.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ แตกต่างกัน ตั้งแต่ อุณหภูมิ 30, 37, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



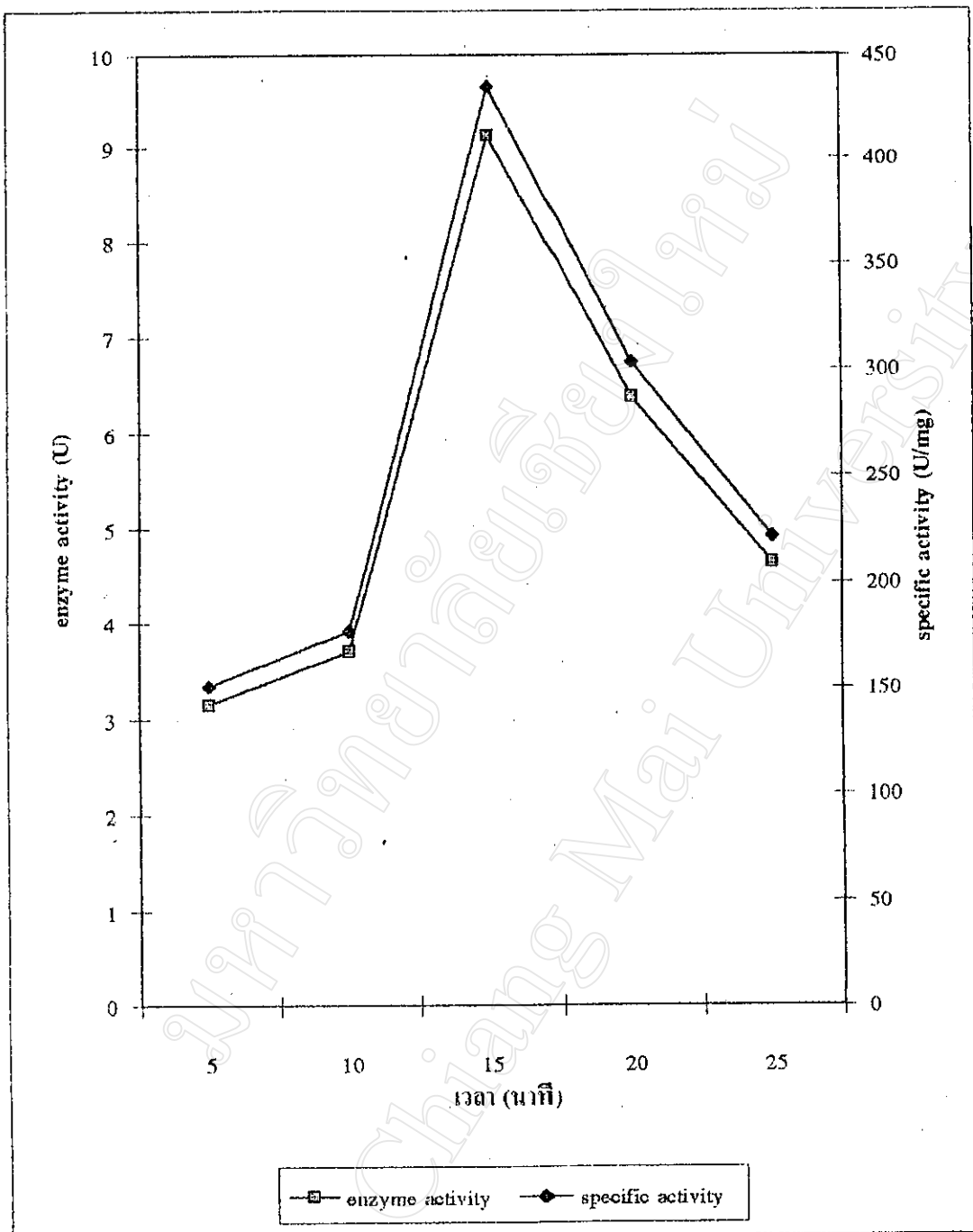
ภาพ 17 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ของอาหารเหลวที่มี locust bean gum 1.5% (w/v) ที่ ความเป็นกรด ต่างของ บัฟเฟอร์ แตกต่างกัน

ตาราง 12 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และ specific activity ได้จากอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มี 1.5 % (w/v) ของ locust bean gum เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์แตกต่างกัน ของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

เวลา (นาท)	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
5	3.155	0.021	150.264
10	3.711	0.021	176.714
15*	9.126	0.021	434.562
20	6.367	0.021	303.174
25	4.649	0.021	221.376

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด.

วัดการทำงานของเอนไซม์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีน จากการทดลอง พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ และ specific activity เท่ากับ 2.855 U และ 142.750 U/mg ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจาก 55 องศาเซลเซียส จนถึง 65 องศาเซลเซียส พบค่าการทำงานของเอนไซม์ลดลง จาก 2.855 เป็น 2.172 U เนื่องจากเอนไซม์มีการเสถียรภาพทางธรรมชาติ ดังตาราง 13 และภาพ 19



ภาพ 18 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ได้จากอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ที่มี 1.5% (w/v) ของ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์แตกต่างกัน

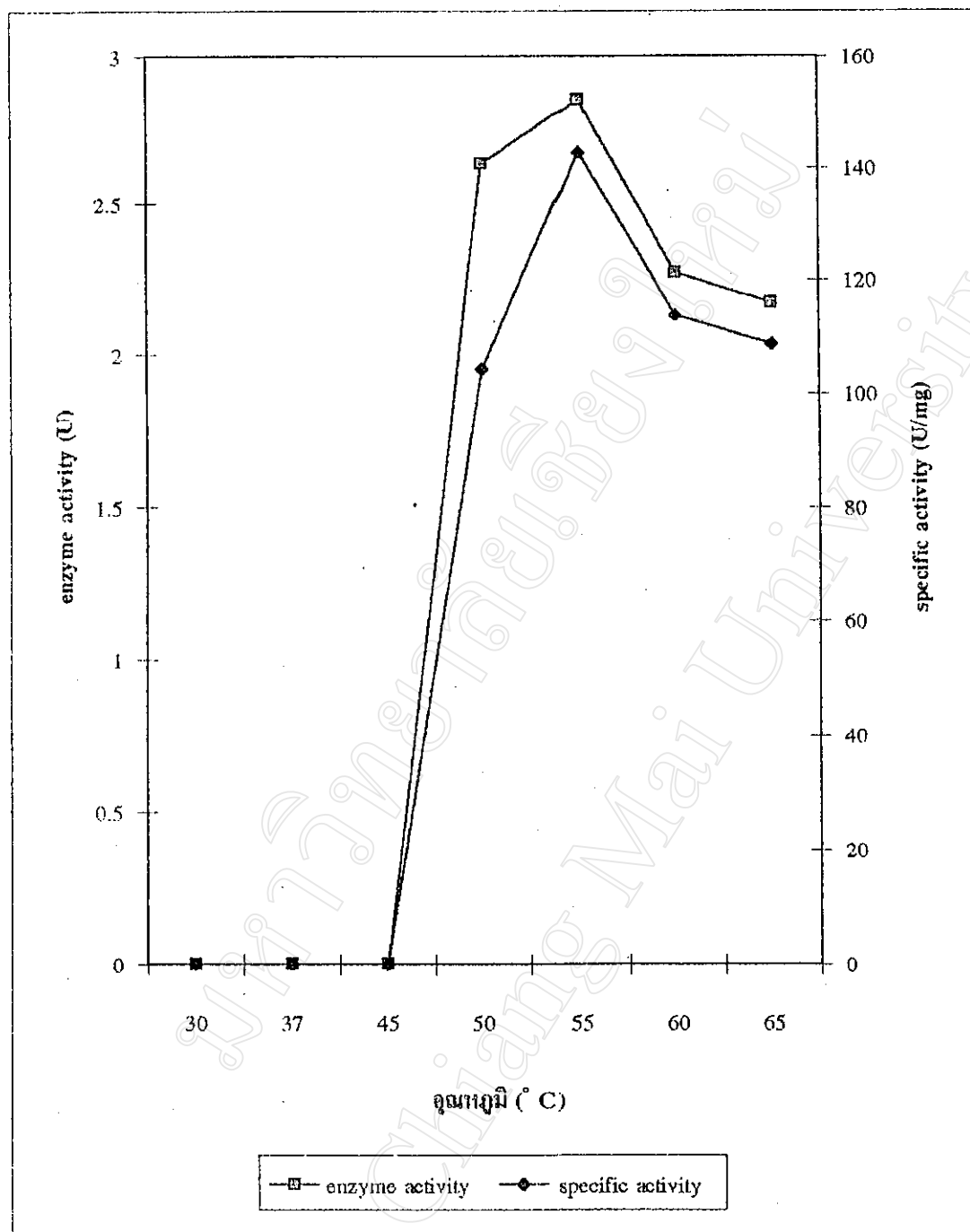
ตาราง 13 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีนและ specific activity ที่ได้จาก อาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ที่มี 1 % (w/v) locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกันที่ pH 5.5 ระยะเวลา 20 นาที

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)
30	-1.694	0.020	-84.700
37	-1.017	0.020	-50.850
45	-1.933	0.020	-96.650
50	2.083	0.020	104.150
55*	2.855	0.020	142.750
60	2.272	0.020	113.600
65	2.172	0.020	108.600

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด

14. ผลการศึกษาระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ต่อการผลิตและการทำงานของ mannanase โดยเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

จากการศึกษาผลของระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อราต่อการผลิตและการทำงานของ mannanase โดยเตรียมอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อรา (enrichment media) และอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ (cultivation media) ซึ่งมี 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ pH 5.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดการทำงานของเอนไซม์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีน จากการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของเชื้อรา เพื่อผลิต



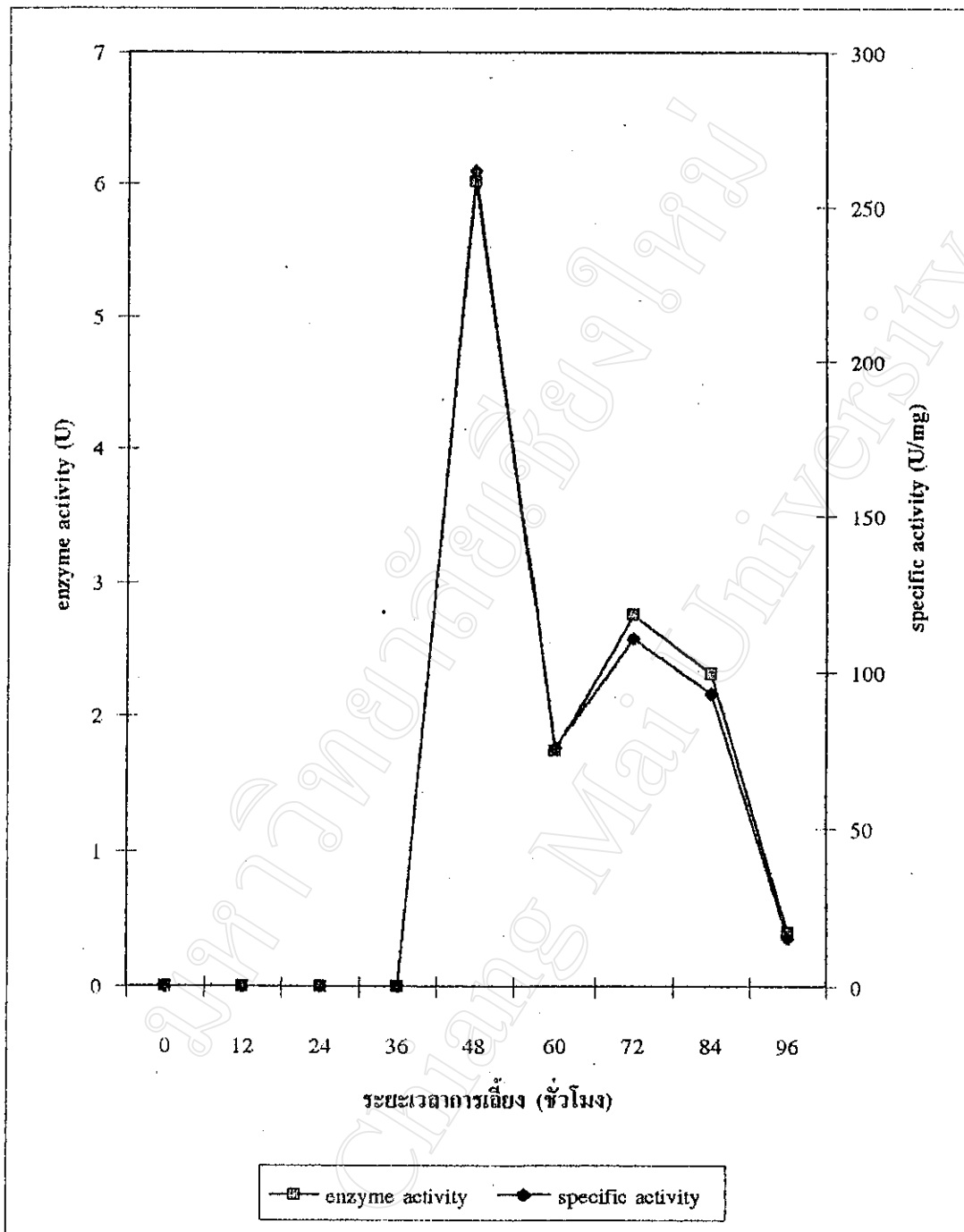
ภาพ 19 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity ได้จากอาหารเหลว เพื่อผลิต mannanase ที่มี 1% (w/v) ของ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

เอนไซม์ คือ 48 ชั่วโมง และอุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์ คือ 15 นาที ใน acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 M. pH 5.5 พบว่า เชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1 มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 6.015 U และมี specific activity เท่ากับ 261.522 U/mg วัดค่าน้ำหนักแห้งของ เชื้อราได้เท่ากับ 0.492 กรัม ดังตาราง 14 และ ภาพ 20

ตาราง 14 การทำงานของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน specific activity และค่าน้ำหนักแห้งจากอาหารเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มี 1.5 % (w/v) ของ locust bean gum เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาแตกต่างกัน บ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 5.5 เป็นเวลา 15 นาที ในระยะเวลาการ เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ของเชื้อรา *Talaromyces* sp. KM-1

ระยะเวลาการเลี้ยง (ชั่วโมง)	enzyme activity (U)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml.เอนไซม์)	specific activity (U/mg)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
0	-1.259	0.024	-52.458	0.422
12	-1.081	0.033	-32.757	0.395
24	-0.474	0.024	-19.750	0.429
36	-0.259	0.023	-11.261	0.443
48*	6.015	0.023	261.522	0.492
60	1.741	0.023	75.696	0.489
72	2.763	0.025	110.520	0.475
84	2.318	0.025	92.720	0.465
96	0.400	0.026	15.385	0.477

หมายเหตุ * enzyme activity และ specific activity มีค่าสูงสุด



ภาพ 20 การทำงานของเอนไซม์ และ specific activity จากเหลวเพื่อผลิต mannanase ที่มี 1.5% (w/v) ของ locust bean gum เพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาแตกต่างกัน