

## สารบัญ

|                                            | หน้า |
|--------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                            | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย                            | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ                         | ฉ    |
| สารบัญตาราง                                | ช    |
| สารบัญภาพ                                  | ฐ    |
| บทที่ 1 บทนำ                               | 1    |
| บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร                        | 3    |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง             | 25   |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง                         | 39   |
| บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง           | 89   |
| บรรณานุกรม                                 | 97   |
| ภาคผนวก                                    | 101  |
| ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม    | 102  |
| ภาคผนวก ข การทำสไลด์กึ่งถาวร               | 106  |
| ภาคผนวก ค เตรียมสารเคมี                    | 107  |
| ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานและการหาปริมาณเอนไซม์ | 110  |
| ประวัติผู้เขียน                            | 116  |

## สารบัญตาราง

| ตาราง                                                                                                                                                                 | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 เอนไซม์ สารตัวให้ สารตัวรับและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจาก<br>การทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอสิโกแซคคาไรด์                                                                 | 24   |
| 2 จำนวนชิ้นส่วนต่างๆของกิ่งไม้ที่มีเชื้อเจริญขึ้น และจำนวนไอโซเลทของ<br>endophytic fungi ที่เจริญขึ้นในส่วนข้อ ปล้องและใบของไม้ 13 ชนิด                               | 40   |
| 3 จำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่งไม้บ่งหนามหลังจากทดสอบ<br>การฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ เป็นเวลา 0-20 นาที                                               | 42   |
| 4 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากไม้ 13 ชนิด จำนวน 36 ต้น                                                                                                                    | 44   |
| 5 จำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่งไม้รวก (TSI) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากต้นที่<br>ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน                                      | 46   |
| 6 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสขนาดต่างๆ<br>ในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion<br>โดยใช้ gel ที่มี substrate แตกต่างกัน 4 ชนิด | 62   |
| 7 จำนวนไอโซเลทและเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสขนาดต่างๆ<br>ในการตรวจวัด mannanase activity ของเชื้อรา 226 ไอโซเลทด้วยวิธี gel diffusion       | 63   |
| 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity<br>และ specific activity ของเชื้อรา 5 ไอโซเลทในการตรวจวัดโดยวิธี DNS method                                        | 64   |
| 9 ค่า enzyme activity และ specific activity จากการตรวจวัดโดยวิธี DNS method<br>และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ตรวจวัดโดยวิธี gel diffusion<br>ของเชื้อรา 5 ไอโซเลท    | 64   |
| 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity<br>และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อเลี้ยงใน<br>cultivation medium 3 สูตร              | 67   |
| 11 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ<br><i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อเลี้ยงใน cultivation medium 3 สูตร                              | 68   |

|    |                                                                                                                                                                            |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 12 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน            | 69 |
| 13 | ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน                         | 69 |
| 14 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างกัน | 71 |
| 15 | ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างกัน              | 72 |
| 16 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด    | 73 |
| 17 | ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด                 | 74 |
| 18 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน         | 75 |
| 19 | ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน                      | 76 |
| 20 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน         | 77 |

- 21 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน 78
- 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium และบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน 79
- 23 ค่า pH crude enzyme, mannanase activity, ปริมาณโปรตีนและ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 79
- 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity ในการศึกษาโคเนติกของการผลิตเอนไซม์ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 81
- 25 ค่า mannanase activity, specific activity, pH crude enzyme, ปริมาณโปรตีน และน้ำหนักแห้งของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ในการศึกษาโคเนติกของการผลิตเอนไซม์ 81
- 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ buffer 2 ชนิดที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที 83
- 27 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ buffer ที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที 83
- 28 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆกัน 85

|    |                                                                                                                                                                                                       |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 29 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า mannanase activity และ specific activity crude enzyme ของ crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน | 86  |
| 30 | ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน                           | 87  |
| 31 | ค่า mannanase activity ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ                                                                                                                                                         | 95  |
| 32 | ปริมาณ mannose และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm                                                                                                                                              | 110 |
| 33 | ปริมาณ bovine serum albumin และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm                                                                                                                                 | 112 |
| 34 | การเตรียม reaction mixture ของเอนไซม์กับ substrate                                                                                                                                                    | 113 |

สารบัญภาพ

| ภาพ                                                                                                                         | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 ก. ใผ่บงหนาม ( <i>B. burmanica</i> Griff) ข. ใผ่เหลื่อง ( <i>B. vulgaris</i> Schrad)                                      | 10   |
| 2 ก. ใผ่เลี้ยง ( <i>B. ventricosa</i> Me Clure) ข. ใผ่บงป่า ( <i>B. longispatha</i> Kurz)                                   | 11   |
| 3 ก. ใผ่บง ( <i>B. natan</i> Wall) ข. ใผ่ป่า ( <i>B. arundinacea</i> Wild)                                                  | 12   |
| 4 ก. ใผ่รวก ( <i>T. siamensis</i> Gamber) ข. ใผ่รวกดำ ( <i>T. oliveri</i> Gamber)                                           | 13   |
| 5 ก. ใผ่ขาง ( <i>D. nudius</i> Pilg) ข. ใผ่ขางคอบ ( <i>D. membranaceus</i> Munro)                                           | 14   |
| 6 ใผ่ตง ( <i>D. asper</i> Backer)                                                                                           | 15   |
| 7 ก. ไม้หกเครือ ( <i>G. nigro-ciliata</i> (Munro) Kurz) ข. ใผ่ดำ ( <i>P. nigra</i> )                                        | 16   |
| 8 โครงสร้างของ locust bean gum                                                                                              | 18   |
| 9 ส่วนต่างๆของกิ่งใผ่ที่ใช้ทดลอง ได้แก่ ข้อ (N), ปล้อง (IN) และใบ (L )                                                      | 29   |
| 10 จำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่ง ใผ่รวกซึ่งเก็บตัวอย่างจากต้น<br>ที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน | 47   |
| 11 ลักษณะของ <i>Mycelia sterilia</i>                                                                                        | 47   |
| 12 ลักษณะ โคลนีสของ <i>Fusarium</i> spp.                                                                                    | 48   |
| 13 ลักษณะสปอร์ของ <i>Fusarium</i> spp.                                                                                      | 49   |
| 14 ลักษณะของ <i>Xylaria</i> spp.                                                                                            | 50   |
| 15 ลักษณะของ <i>Phoma</i> spp.                                                                                              | 51   |
| 16 ลักษณะของ <i>Colletotrichum</i> spp.                                                                                     | 51   |
| 17 ลักษณะของ <i>Phomopsis</i> spp.                                                                                          | 52   |
| 18 ลักษณะของ <i>Cladosporium</i> sp.                                                                                        | 53   |
| 19 ลักษณะของ <i>Arthrimum</i> spp.                                                                                          | 53   |
| 20 ลักษณะของ <i>Arthrographis</i> sp.                                                                                       | 54   |
| 21 ลักษณะของ <i>Cephalosporium</i> sp.                                                                                      | 54   |
| 22 ลักษณะของ <i>Penicillium</i> spp.                                                                                        | 55   |
| 23 ลักษณะของ <i>Curvularis</i> spp.                                                                                         | 55   |

|    |                                                                                                                                                               |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 24 | ลักษณะของ <i>Drechlera</i> spp.                                                                                                                               | 56 |
| 25 | ลักษณะของ <i>Pestalotiopsis</i> sp.                                                                                                                           | 56 |
| 26 | ลักษณะของ <i>Pithomyces</i> spp.                                                                                                                              | 57 |
| 27 | ลักษณะของ <i>Harknessia</i> sp.                                                                                                                               | 58 |
| 28 | ลักษณะของ <i>Nigrospora</i> sp.                                                                                                                               | 58 |
| 29 | ลักษณะของ <i>Papularia</i> spp.                                                                                                                               | 59 |
| 30 | ลักษณะของ <i>Gonatobotry</i> sp.                                                                                                                              | 59 |
| 31 | ลักษณะของ <i>Sporothrix</i> sp.                                                                                                                               | 60 |
| 32 | ลักษณะของ <i>Helicoon</i> sp.                                                                                                                                 | 60 |
| 33 | ลักษณะของ <i>Chaetobolista</i> sp.                                                                                                                            | 61 |
| 34 | จำนวนไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่าศูนย์กลางวงใส<br>ขนาดต่างๆในการตรวจวัด mannanase activity ของเชื้อรา 226 ไอโซเลท<br>ด้วยวิธี gel diffusion | 63 |
| 35 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของเชื้อรา 5 ไอโซเลท                                                                                             | 65 |
| 36 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลท GnCMU384 บนอาหาร PDA, CMA,<br>MA with rose bengal, LBA, และ WA ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว<br>บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน    |    |
| 37 | ลักษณะ microconidia (ก) และ macroconidia (ข) ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384                                                                                 | 66 |
| 38 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ<br><i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium 3 สูตร                                        | 66 |
| 39 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384<br>ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน                   | 68 |
| 40 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384<br>ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างๆกัน          | 70 |
| 41 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384<br>ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด              | 72 |

|    |                                                                                                                                                                         |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 42 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน                                | 76  |
| 43 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน                                | 78  |
| 44 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน                                  | 80  |
| 45 | ค่า mannanase activity specific activity และ pH crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 ในการศึกษาโคเอนดิคของการผลิตเอนไซม์                                       | 82  |
| 46 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อใช้ buffer ที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที | 84  |
| 47 | ค่า mannanase activity และ specific activity ของ crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 7.0 บ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆกัน    | 85  |
| 48 | ค่า mannanase activity ของ crude enzyme ของ <i>Fusarium</i> sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน                                | 87  |
| 49 | ผลิตผลที่ได้จากการทำงานของ crude enzyme ที่หมักใน 1% locust bean gum นาน 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)                                            | 88  |
| 50 | กราฟมาตรฐานของ mannose กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 nm                                                                                                        | 111 |
| 51 | กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm                                                                                           | 112 |