

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ส่วนต่างๆของกิ่งไม้ ด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ก่อนนำมาแยก endophytic fungi

หลังจากนำอย่างกิ่งไม้พวงหนาม (*B. burmanica* Griff) มาผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิว ด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่เวลานานต่างๆกัน พบว่าส่วนข้อและปล้องถ้าใช้เวลา 3-5 นาที endophytic fungi ที่แยกได้ไม่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้ออื่นๆ แต่หากแช่ในสารฆ่าเชื้อนี้ เพียง 0-2 นาที เชื้อที่แยกได้มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ด้วยโดยเฉพาะพวกแบคทีเรีย สำหรับส่วนใบซึ่งแยกเชื้อได้น้อยมากใช้เวลา 2 นาที ชิ้นส่วนที่บ่มไว้นาน 20 วันแม้ไม่มีเชื้อเจริญขึ้นก็ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นในการแยกเชื้อจากกิ่งไม้อื่นๆจึงฆ่าเชื้อปนเปื้อนที่ผิวส่วนข้อและปล้อง ด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์โดยใช้เวลาในการแช่สารนาน 5 นาที สำหรับส่วนใบใช้เวลา เพียง 2 นาที

2. ผลการแยก endophytic fungi จากกิ่งไม้

สามารถแยก endophytic fungi จากกิ่งไม้ 5 สกุล จำนวน 7 ชนิดจากเชิงคอยสุเทพ-ปุยคือ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ บนอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุยตามจุดต่างๆคือ น้ำตกมณฑาธารจุดชมวิวกว๊านดอกม้า สวนสมุนไพรสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ และที่ทำการอุทยานฯ ซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 300, <1000, และ 1000-1500 เมตร ในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว และ ไม้ปลูก 3 สกุล จำนวน 9 ชนิดจากหมู่บ้านหาดแพน จังหวัดพะเยา ซึ่งมีความสูง 300 m จากระดับน้ำทะเล ในช่วงฤดูฝน ได้เชื้อราทั้งสิ้น 636 ไอโซเลท ส่วนใหญ่แยกได้จากข้อของกิ่งไม้ รองลงมาคือส่วนปล้อง สำหรับใบแยกเชื้อได้น้อยมาก เพอร์เซ็นต์จำนวนชิ้นของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆที่มีเชื้อเจริญขึ้นมีค่าเท่ากับ 65.74%, 28.37% และ 5.88 % ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์จำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่เจริญจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆมีค่าเท่ากับ 68.81%, 26.30% และ 4.89 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากิ่งอ่อนจะมีจำนวนและชนิดของเชื้อน้อยกว่ากิ่งแก่ด้วย (ตาราง 2) จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมาจัดกลุ่ม แล้วเลือกตัวแทนแต่ละกลุ่มไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างสปีชีส์ เพื่อบ่งบอกชนิดระดับ genus โดยเทียบกับ key มาตรฐานต่อไป

ตาราง 2 จำนวนชิ้นส่วนต่างๆของกิ่งไผ่ที่สืบเชื้อสายจาก endophytic fungi ที่เจริญขึ้นในส่วนข้อ ปล้องและใบของไผ่ 13 ชนิด

Bamboos	ความสูง จากระดับน้ำทะเล (ม.)	สถานที่เก็บ	No.	ฤดู	อายุ	จำนวนชิ้น		จำนวนใบไผ่	
						ที่มีเชื้อราเจริญขึ้น*	leave	node	internode leave
1. ไผ่พรวนไผ่ (Bambusa arundinacea Wile), BAR	300	พะเยา	32 ¹	ฝน	แก่	10	4	0	11 4 0
2. ไผ่ขมหวาน (B. burmanica Griff), BBU	1000-1500	ห้วยขมิ้น (ส)	1-3 ¹	ฝน	แก่	3	2	0	3 2 0
3. ไผ่ขมิ้น (B. longispatha Kurz), HLO	300	พะเยา	29 ¹	ฝน	แก่	10	6	0	10 6 0
4. ไผ่ขม (B. nana Wall), BNA	300	พะเยา	30 ¹	ฝน	แก่	10	4	2	14 4 0
5. ไผ่ขม (B. ventricosa McClure), BVE	300	มข. (ส)	40, 42 ²	ฝน	อ่อน	7	2	0	8 2 0
			21, 41, 43 ³	ฝน	แก่	10	2	0	12 2 0
6. ไผ่ขม, BVU	300	มข. (ส)	4-6 ³	ฝน	แก่	2	1	0	2 1 0
(B. vulgaris schrad. et verd. Var striata (Lodd. ex Penny) Gamb.)		พะเยา	31 ¹	ฝน	แก่	9	7	0	9 7 0
	1000-1500	สวนสมุนไพร (ส)	7 ¹	ฝน	แก่	4	0	0	4 0 0
7. ไผ่ขม (Dendrocalamus asper Backer), DAS	300	พะเยา	34 ¹	ฝน	แก่	9	3	0	9 3 0
8. ไผ่ขม (D. membranaceus Munro), DME	300	มข. (ส)	22 ¹	ฝน	อ่อน	3	1	0	3 1 0
			23 ¹	ฝน	แก่	10	10	5	13 11 6
9. ไผ่ขม (D. madus Pig), DNU	300	พะเยา	33 ¹	ฝน	แก่	10	3	1	15 3 1
		พะเยา	28 ¹	ฝน	แก่	10	7	0	14 7 0

ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิดไม้	ความสูง จากระดับน้ำทะเล	สถานที่เก็บ	No.	ฤดู	อายุ	จำนวนกิ่งที่มีเงา		จำนวนไอโซเลทเชื้อรา ที่เจริญขึ้นแต่ละ	
						node	internode	node	internode
10. ไผ่กวนอิม (Gigantochloa nigro-ciliata (Munro) Kurz), GNI	<1000	นบพาร (ส)	18-20 ³	ฝน	แก่	10	3	11	3
		หัวตอกน้ำ (ส)	0-000 ³	หนาว	แก่	0	0	0	0
11. ไผ่ดำ (Phyllostachys nigra), PNI	1000-1500	ที่ทำการฯ (ส)	15-17 ¹	ฝน	แก่	10	7	12	8
			35 ¹	ฝน	อ่อน	7	3	8	3
			36 ¹	ฝน	แก่	10	9	13	10
12. ไผ่วกคำ (Thyrostachys oliveri Gamble), TOL	300	พะเยา	27 ¹	ฝน	แก่	10	1	13	1
13. ไผ่รวก (T. siamensis Gamble), TSI	300	มข. (ส)	8-10 ³	ฝน	อ่อน	1	0	1	0
			37-39 ³	ฝน	แก่	10	1	10	1
		พะเยา	24-26 ³	ฝน	แก่	6	2	6	2
	<1000	นบพาร (ส)	12-14 ²	ฝน	แก่	10	2	13	2
	1000-1500	ที่ทำการฯ (ส)	11 ¹	ฝน	แก่	9	2	11	3
				รวม		190	82	225	86
				%		65.74	28.37	68.81	26.30
							5.88		4.89

หมายเหตุ * = เฉลี่ยใน 1 ต้น จากการนำกิ่งไม้นานาคละ 3 หรือ 2 หรือ 1 ต้น ต้นละ 1 กิ่ง ตัดส่วนข้อ ป้องและใบส่วนละ 10 ชิ้น (รวม 30 ชิ้น)

³ = 3 ต้น, ² = 2 ต้น และ ¹ = 1 ต้น

3. ผลการตรวจสอบและบ่งบอกชนิดเชื้อรา endophyte ที่แยกได้

หลังจากตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างสปีพันธุ์ของตัวแทนเชื้อราที่แยกได้ แล้วนำไปเทียบกับ key มาตรฐาน สามารถบ่งบอกชนิดของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดดังนี้

เชื้อราที่แยกได้จากการทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆของกิ่งไผ่บงหนาม (*Bambusa burmanica*, BBU) ด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์

ส่วนต่างๆของกิ่งไผ่บงหนามที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์และที่แช่สารฆ่าเชื้อนี้เพียง 1 นาที มีจำนวนและชนิดของเชื้อรามากกว่าเมื่อแช่นานขึ้นเป็นเวลา 2-20 นาที แต่อาจมีเชื้อปนเปื้อนซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิดใดรวมอยู่ด้วยด้วย หากแช่ไว้นานถึง 20 นาทีเชื้อที่แยกได้มีน้อยชนิดที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *Phoma* spp. และ *Mycelia sterilia* (19 subgroup) เป็นกลุ่มที่พบได้ในทุกชุดการทดลอง genus ที่พบเพียงเล็กน้อยปรากฏดังตาราง 3

ตาราง 3 จำนวน*และชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่งไผ่บงหนามหลังจากทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นเวลา 0-20 นาที

Endophytic fungi	เวลาในการแช่ใน 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (นาที)									
	0	1	2	3	4	5	10	15	20	รวม
<i>Colletotrichum</i> spp.	1									1
<i>Curvularia</i> sp.		1						2		3
<i>Chaetobolus</i> sp.						1				1
<i>Fusarium</i> spp.	1							1		2
<i>Gonatobotrys</i> sp.	1									1
<i>Heliconia</i> sp.				1						1
<i>Phoma</i> spp.	2	2	3	1	2	1	1	6	2	20
<i>Phomopsis</i> spp.			2	1						3
<i>Scytalidium</i> sp.	1	1	1							3
<i>Sporothrix</i> sp.		1								1
<i>Xylaria</i> spp.	4					2			1	7

ตาราง 3 (ต่อ)

Endophytic fungi	เวลาในการแช่ใน 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (นาทิจ)									
	0	1	2	3	4	5	10	15	20	รวม
<i>Mycelia sterilia</i> (19 Subgroup)	7	7	5	8	2	5	2	3	1	40
<i>Xylariaceae</i>		1			1		1			3
<i>Coelomycetes</i> (1 Subgroup)	1									1
<i>Hyphomycetes</i> (6 Subgroup)	2	1	1	1	2	1	2			10
รวมจำนวน (ไอโซเลท)	20	14	12	12	7	10	6	12	4	97
รวมชนิด	9	7	5	5	4	5	4	4	3	15

หมายเหตุ * = จำนวนไอโซเลทของเชื้อราเฉลี่ยใน 1 ต้น โดยนำกิ่งไม้ชนิดนี้มาจาก 3 ต้นที่เจริญอยู่ในบริเวณเดียวกัน จำนวนต้นละ 1 กิ่ง ตัดส่วนข้อ ปล้องและใบส่วนละ 10 ชิ้น (รวม 30 ชิ้น)

เชื้อราที่แยกได้จากไม้ 13 ชนิดจำนวน 36 ต้น

เชื้อราในไม้ทุกชนิดทุกต้นที่ได้ทดลองในครั้งนี้ปรากฏผลดังนี้คือ พบ *Mycelia sterilia* มากที่สุด จำนวน 97 ไอโซเลท ซึ่งพบในไม้ทุกชนิด รองลงมาคือ *Fusarium* spp. จำนวน 72 ไอโซเลท เชื้อที่พบมากเป็นอันดับสาม จำนวน 30-33 ไอโซเลท ได้แก่ *Xylaria* spp. และ *Phoma* spp. เชื้อที่ไม่สามารถบ่งบอกชนิดหมายเลข 1, 2 และ *Colletotrichum* spp. พบมากเป็นอันดับสี่ จำนวน 16-18 ไอโซเลท ส่วน *Phomopsis* spp., *Cladosporium* sp., *Artrinium* sp. และ เชื้อที่ไม่สามารถบ่งบอกชนิดหมายเลข 3 พบในความถี่ค่อนข้างต่ำ จำนวน 5-10 ไอโซเลท และเชื้อที่พบน้อย ได้แก่ *Arthrographis* sp., *Aspergillus*, *Cephalosporium* sp., *Chaetobolisia* sp. *Curvularia* sp., *Drechslera* spp., *Harknessia* sp., *Helicoon* sp., *Nigrospora* sp., *Papularia* spp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pithomyces* spp., *Syringospora* sp. และ *Xylariaceae* อย่างละ 1-3 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ใน class *Hyphomycetes* จำนวน 3 กลุ่มย่อย และ *Coelomycetes* จำนวน 27 กลุ่มย่อย (ตาราง 4)

ตาราง 4 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากไม้ 13 ชนิด จำนวน 36 ต้น

No.	Genus	BAR	BBU	BLO	BNA	BVE	BVU	DAS	DME	DNU	TOL	TSI	GNI	PNI	รวมจำนวน												
32		1-3*	29	30	40,42*	21,41,43*	4-6*	31	7	34	22	23	33	28	27	8-10*	37-39*	24-26*	11	12-14*	15-17*	18-20*	35	36	รวมต้นที่มีเชื้อ		
1	<i>Arthrographis</i> sp.																								1	1	
2	<i>Aspergillus</i> sp.						3																		3	1	
3	<i>Arthrinium</i> sp.					1																			5	5	
4	<i>Cephalosporium</i> sp.						1																		1	1	
5	<i>Chaetobolus</i> sp.																								1	1	
6	<i>Cladosporium</i> sp.																								8	6	
7	<i>Colletotrichum</i> spp.					2																			3	17	9
8	<i>Curvularia</i> sp.																								1	1	
9	<i>Drechslera</i> spp.																								2	2	
10	<i>Fusarium</i> spp.	4				1	4	8	4																72	16	
11	<i>Harknessia</i> sp.																								1	1	
12	<i>Helicon</i> sp.																								1	1	
13	<i>Nigrospora</i> sp.																								1	2	2
14	<i>Papularia</i> spp.																								2	2	
15	<i>Penicillium</i> sp.																								3	2	
16	<i>Pestalotiopsis</i> sp.																								1	1	
17	<i>Phoma</i> spp.	3	1	1	2	1																			5	30	13

ตาราง 4 (ต่อ)

No.	Genus	BAR	BBU	BLOBNA	BVE	BVU	DAS	DME	DNUTOL	TSI	GNI	PNI	รวมจำนวน													
18	<i>Phomopsis</i> spp.	32	1-3*	29	30	40,42*, 21,41,43* 4-6*	31	7	34	22	23	33	28	27	8-10* 37-39* 24-26*	11	12-14* 15-17* 18-20*	35	36	รวม ต้นไม้มีเชื้อ						
19	<i>Pithomyces</i> spp.																									
20	<i>Syringospora</i> sp.				1																					
21	<i>Xylaria</i> spp.	1	2	1	1	2																				
22	<i>Xylariaceae</i> (1 subgroup)																									
23	<i>Mycelia sterilia</i> (42 subgroup)	6	5	2	9	2	2	1	3	2	6	1	3	1	5	2	2	9	14	4	2	5	97	23		
24	unidentifly1 (<i>Hyphomycetes</i>)			6																						
25	unidentifly2 (<i>Hyphomycetes</i>)				1																					
26	unidentifly3 (<i>Hyphomycetes</i>)			1	1																					
27	<i>Coelomycetes</i> (3 subgroup)																									
28	<i>Hyphomycetes</i> (27 subgroup)	1	1	1	5	2	1																			
รวมจำนวน		15	10	11	21	12	24	6	16	4	12	3	23	17	20	13	2	30	12	13	25	33	18	17	21	378
รวมชนิดเชื้อรา		5	5	5	8	6	8	5	7	3	6	2	6	6	8	6	2	19	6	3	8	9	8	7	6	26

หมายเหตุ * คือ จำนวนไฮลิตของเชื้อราเฉลี่ยใน 1 ต้น โดยนับกิ่งไม้แต่ละชนิดจาก 3 หรือ 2 ต้นที่เจริญอยู่ในบริเวณเดียวกัน จำนวนต้นละ 1 กิ่ง ต้นส่วนเชื้อ ปล้องและใบ

ส่วนละ 10 ต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าไผ่รวก (*Thyrostachys siamensis*, TSI) จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มีชนิดของเชื้อราหลากหลายที่สุด โดยมีจำนวนประมาณ 19 ชนิด ส่วนไผ่ชนิดอื่นๆพบเพียง 2-10 ชนิดขึ้นอยู่กับความแก่อ่อนของกิ่งไผ่ที่นำมาทดลอง

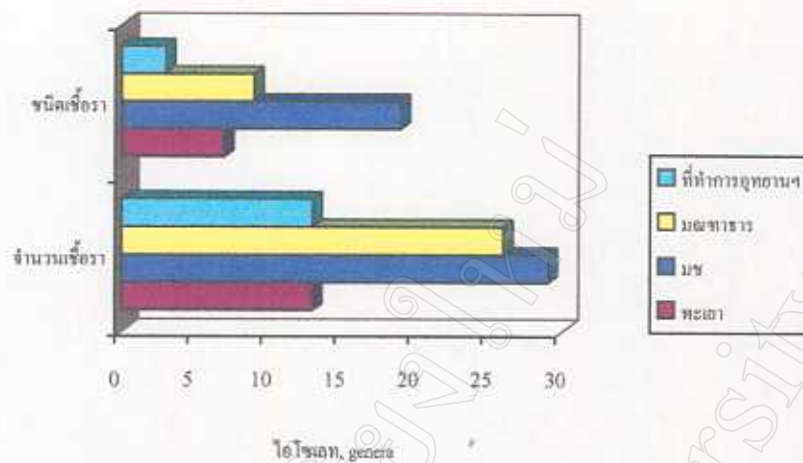
ผลการเปรียบเทียบจำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่งไผ่รวก (*Thyrostachys siamensis*, TSI) ที่เก็บตัวอย่างจากต้นที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน

เชื้อที่พบในกิ่งไผ่รวกที่เก็บจากบริเวณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (300 m) มีความหลากหลายของเชื้อรามากที่สุด รองลงมาคือจากน้ำตกมณฑาธาร (<1000 m) แต่ในกิ่งไผ่จากต้นที่ขึ้นบริเวณที่ทำการอุทยานคอยสุเทพ (1000-1500 m) มีจำนวนและชนิดของเชื้อราน้อยที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างไผ่ที่ได้จากจังหวัดพะเยาและมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าไผ่จากจังหวัดพะเยามีเชื้อราที่หลากหลายน้อยกว่าไผ่จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่พบในทุกพื้นที่คือ *Fusarium* spp. และ *Mycelia sterilia* (No.10 และ 23 ตามลำดับ) ดังข้อมูลที่ปรากฏในตาราง 5 ภาพ 10

ตาราง 5 จำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกิ่งไผ่รวก (TSI) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากต้นที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง	ความสูงจากระดับน้ำทะเล (m)	จำนวนเชื้อราเฉลี่ยจาก 3 ต้น (ไอโซเลท)	จำนวนชนิดของเชื้อราที่พบ	No.* ชนิดเชื้อราที่พบ
หมู่บ้านหาดแพน, พะเยา	300	13	7	6, 7, 10, 23, 26, 28
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	300	29	19	3, 6-9, 10-14, 16-17, 19, 22, 23-24, 26-28
น้ำตกมณฑาธาร	<1000	26	9	3, 6-7, 10, 17, 21, 23, 28
ที่ทำการอุทยานฯ	1000-1500	13	3	10, 18, 23

หมายเหตุ No.* = หมายเลขชนิดเชื้อที่เรียงตามลำดับในตาราง 4

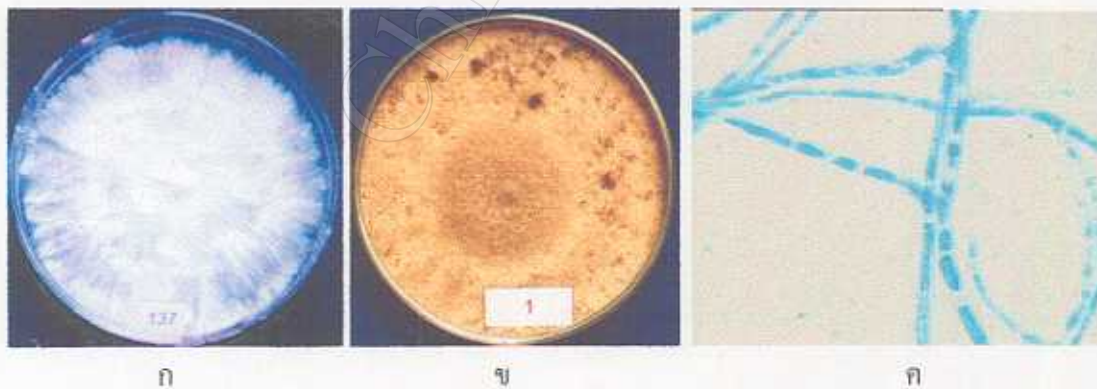


ภาพ 10 จำนวนและชนิดของเชื้อราที่พบในกึ่งไผ่รวก (TSI) ซึ่งเก็บตัวอย่างจากดินที่ขึ้นอยู่ในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อราที่แยกได้

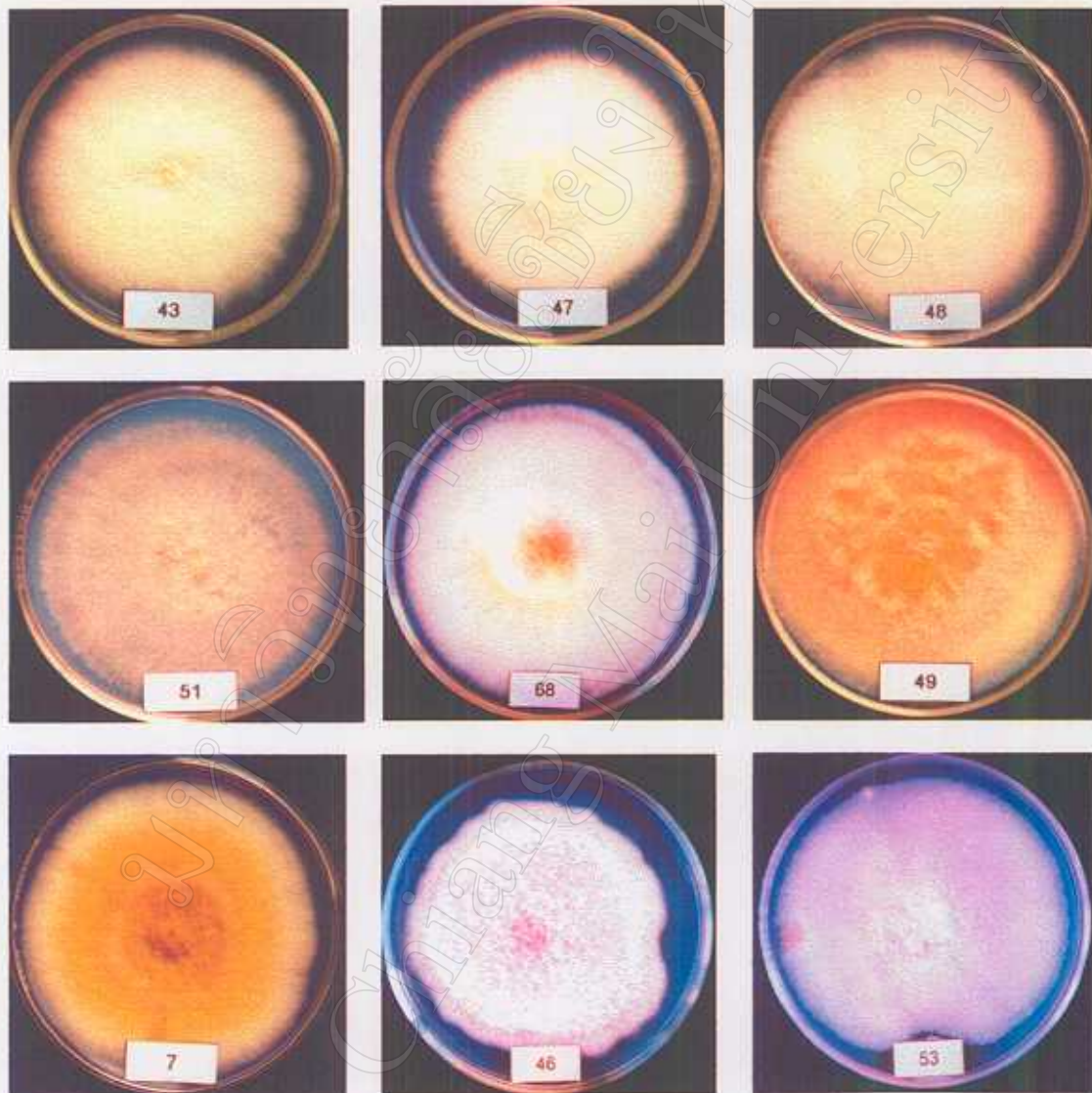
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่า โครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราชนิดต่างๆ ที่แยกได้มีลักษณะดังนี้

Mycelia sterilia โคลนีสสีขาว เทา น้ำตาล หรือดำ ลักษณะการเจริญอาจเป็นได้หลายแบบคือ เจริญดีมาก เจริญดีปานกลาง หรือเจริญไม่ค่อยดี เส้นใยมีทั้งแบบฟูและไม่ฟู มีผนังกันตามขวางบนเส้นใย ไม่พบโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (ภาพ 11 ก-ค) อาจกระตุ้นให้มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์โดยการเลี้ยงในอาหารเฉพาะที่เหมาะสม การให้แสง UV สลับกับแสงธรรมชาติ เป็นต้น



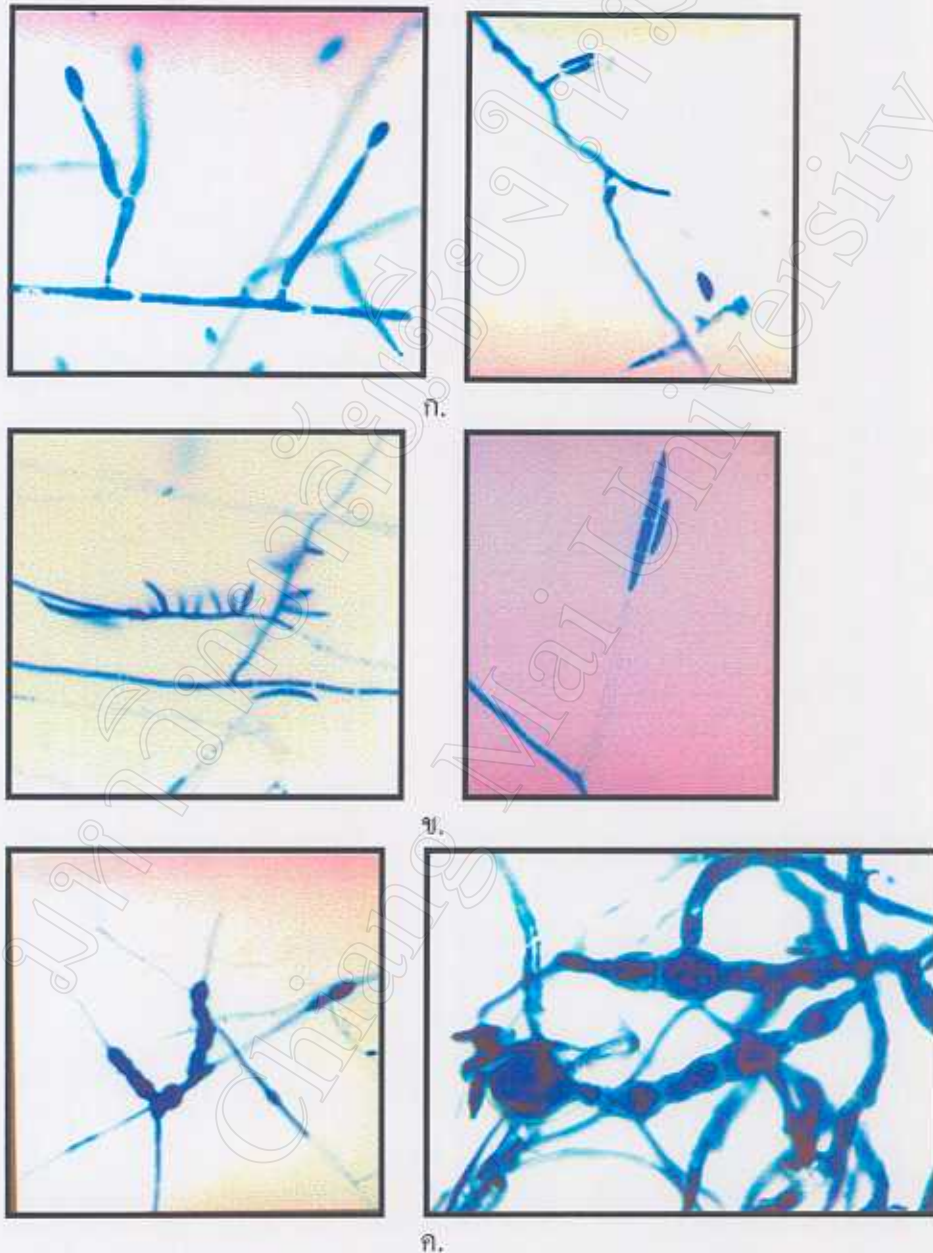
ภาพ 11 *Mycelia sterilia*. ก. โคลนีสสีขาว ข. โคลนีสสีน้ำตาล ค. เส้นใยมีผนังกันและไม่พบโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (ย้อม cotton blue)

Fusarium spp. โคลนีสีขาว สีม่วง สีชมพูหรือสีเหลือง เส้นใยเจริญดีมีลักษณะเหมือนสำลี (ภาพ 12) conidiophore แตกต่างกันไป เช่น ผอมบางไม่แตกกิ่งก้าน หรืออ้วนสั้นแตกกิ่งก้านไม่สม่ำเสมอ หรือมี phialide เกิดเป็นวง เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มภายใน sporodochia สร้าง conidia ไม่มีสี ส่วนใหญ่มี 2 แบบคือ macroconidia มีหลายเซลล์ โค้ง-



ภาพ 12 โคลนีสีต่างๆคือ สีขาว สีเหลือง สีชมพู และสีม่วงของ *Fusarium* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เล็กน้อย หรืออาจโค้งเฉพาะส่วนปลาย โดยทั่วไปจะเป็นรูปจันทร์เสี้ยวหรือรูปเรือ (conoe shaped) ส่วน microconidia มี 1 เซลล์ รูปไข่หรือค่อนข้างยาว เกิดเดี่ยวๆหรือเป็นลูกโซ่ บางอันอาจมี 2-3 เซลล์ได้ (ภาพ 13)

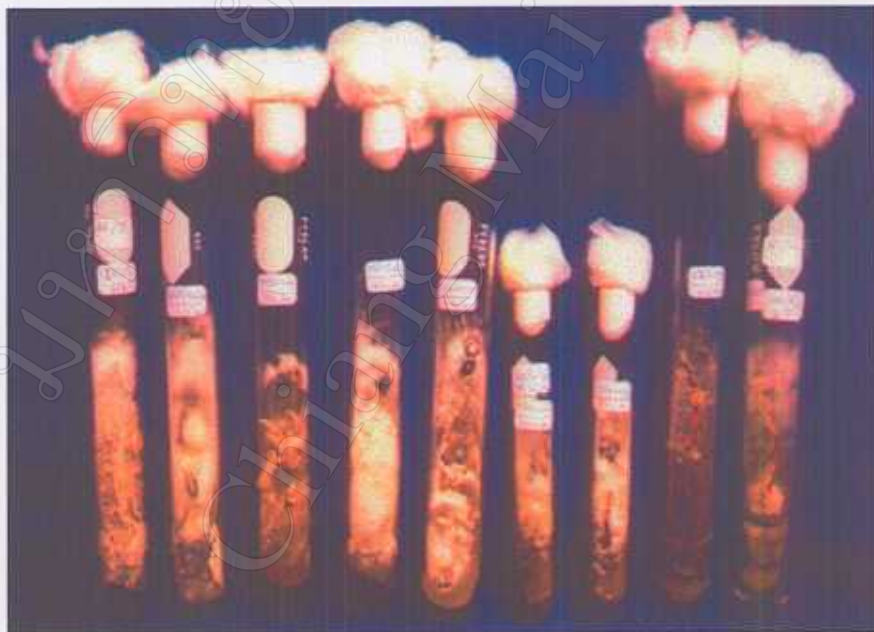


ภาพ 13 สปอร์แบบต่างๆของ *Fusarium* spp. ก. Microconidia ไม่มีสีที่เกิดบน conidiophore
ข. Macroconidia ค. Chlamydospore (สปอร์ข้อมดัดสี cotton blue)

Xylaria spp. โคลนีลักษณะสีขาว ขาวปนสีดำ น้ำตาล ดำ เส้นใยเจริญดี ขอบ
โคโลนีอาจเรียบหรือหยัก (ภาพ 14ก) สร้าง pseudostroma หลายลักษณะ เช่น รูปทรงกระบอกยาว
คล้ายกิ่งไม้ ผอมยาวคล้ายเส้นผม เป็นต้น (ภาพ 14ข) บางชนิดสร้าง conidia ในระยะ anamorph
อาจเกิดบนผิวโคโลนี หรือเกิดบริเวณรอบผิวของ pseudostroma หรือเกิดส่วนปลายของ
pseudostroma conidia รูปไข่ คล้ายกระบอง ยาวเรียวหัวท้ายแหลมหรือปลายมน บางชนิดอาจ
สร้าง stroma ระยะ teleomorph ได้



ก.



ข.

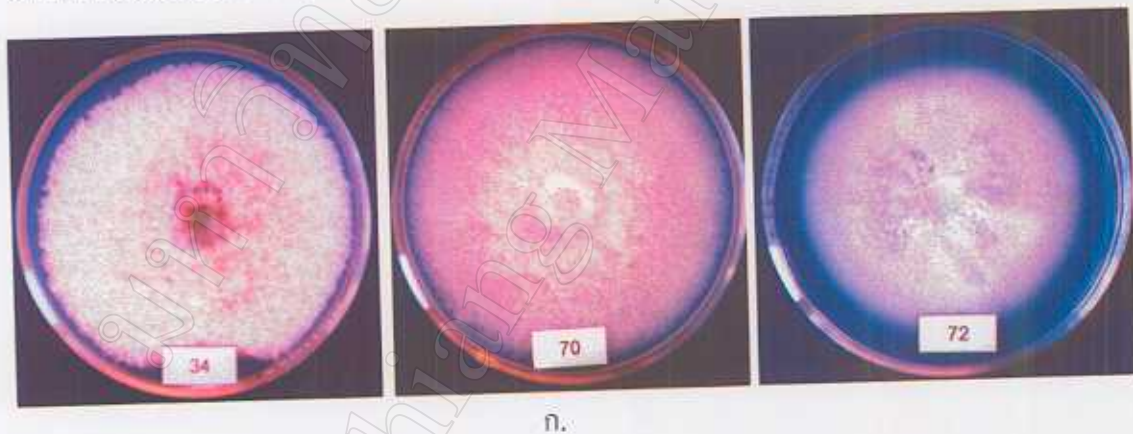
ภาพ 14 *Xylaria* spp. ก. โคลนีสีขาว ขาวปนดำ ข. ลักษณะของ pseudostromata แบบต่างๆที่
สร้างบนอาหาร PDA slants

Phoma spp. โคลนีสีน้ำตาล เจริญค่อนข้างดี สร้าง pycnidia สีน้ำตาลดำ conidia โสหรือสีน้ำตาลอ่อน รูปไข่หรือรูปกระสวย มีเซลล์เดียวหรือ 2 เซลล์ (ภาพ 15)

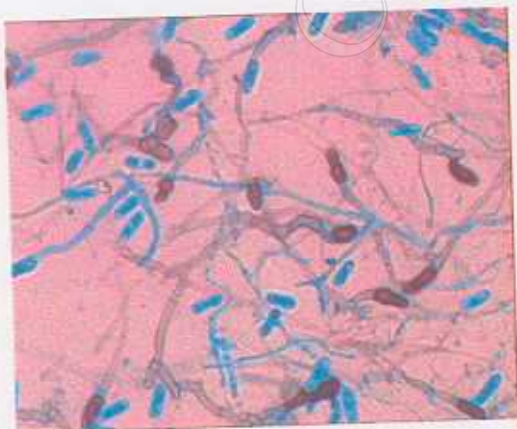


ภาพ 15 *Phoma* spp. ก. โคลนี ข. ลักษณะ pycnidia ค. ลักษณะสปอร์รูปกระสวย

Colletotrichum spp. โคลนีสีขาว เทา น้ำตาลจนถึงดำ มีลักษณะค่อนข้างฟูหรือเรียบแน่น เมื่อเริ่มแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเทา conidia ไม่มีสี มี 1 เซลล์ รูปไข่หรือยาว บางชนิดอาจสร้าง appressoria ด้วย (ภาพ 16)



ก.



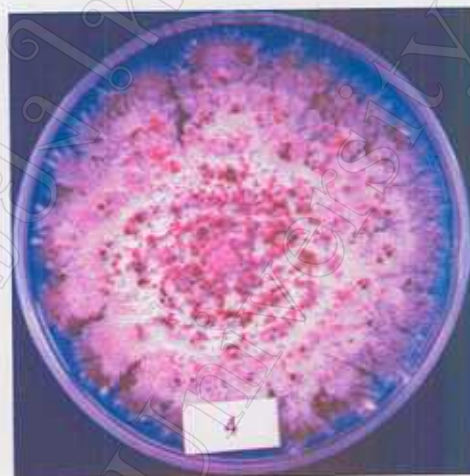
ภาพ 16 *Colletotrichum* spp.

ก. ลักษณะ โคลนี

ข. สปอร์ใสย้อมติดสี cotton blue

และ appressoria ที่เข้ม

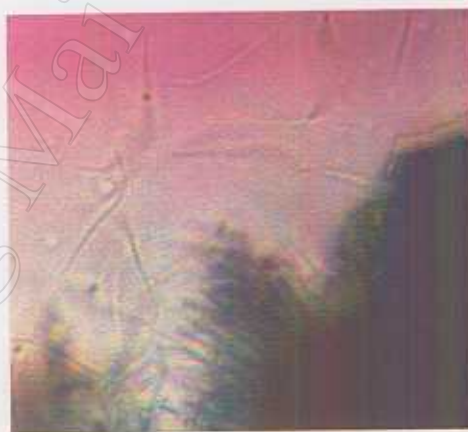
Phomopsis spp. โคลนีสีเทาหรือขาว สร้าง pycnidia ที่น้ำตาลดำ conidiophore โส มีผนังกัน รูปทรงกระบอก มี conidia 2 แบบคือ α -conidia ซึ่งโต รูปไข่หรือหัวแหลมท้ายแหลม มีเซลล์เดียว ขนาดประมาณ $6.5-9.0 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$ อีกแบบหนึ่งคือ β -conidia ซึ่งพบได้มากกว่า มีลักษณะโต รูปร่างเป็นแบบโค้งงอ (filiform) (ภาพ 17)



ก.



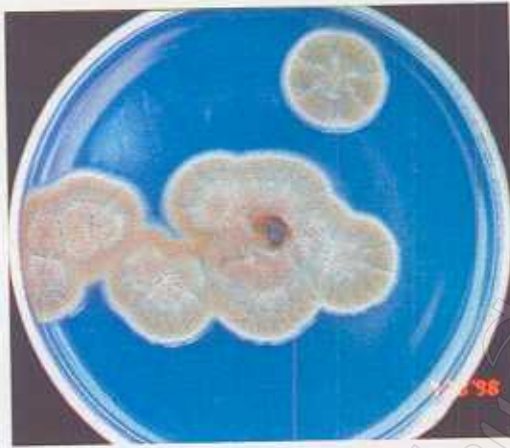
ข.



ค.

ภาพ 17 *Phomopsis* spp. ก. โคลนีสีเทาหรือสีขาว ข. α -conidia ค. β -conidia

Cladosporium sp. โคลนีสีเขียว เมื่อเริ่มแก่เปลี่ยนเป็นสีเทา เส้นใยค่อนข้างฟู
conidiophore สีเข้ม conidia สีเข้ม มี 1-2 เซลล์ รูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปทรงกระบอก (ภาพ 18)



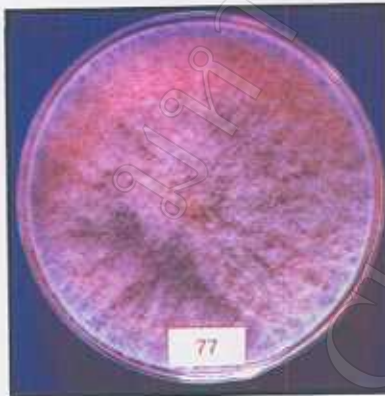
ก.



ข.

ภาพ 18 *Cladosporium* sp. ก. โคลนีสีเขียว ข. Conidia สีเข้ม มี 1 หรือ 2 เซลล์

Artrinium spp. โคลนีสีขาวหรือสีเทา เส้นใยค่อนข้างฟู conidiophore ตั้งตรง
เป็นแบบธรรมดามีผนังกันสีเข้ม สร้าง conidia แบบ meristem blastospores สีเข้ม มี 1 เซลล์ รูป
ร่างกลม รูปไข่ (ภาพ 19)



ก.



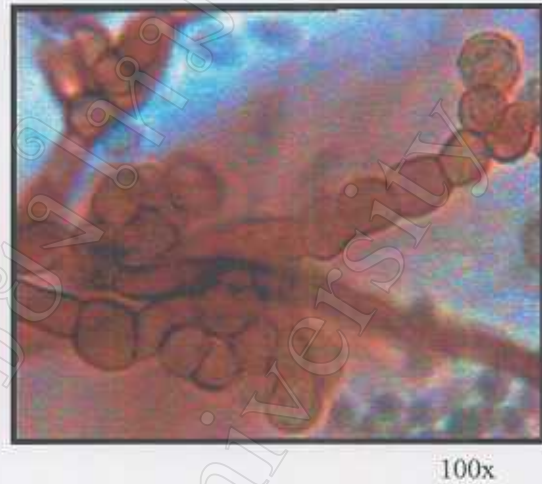
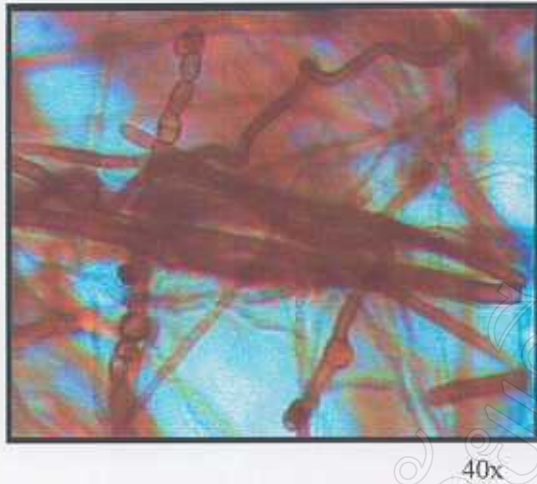
ข.



ค.

ภาพ 19 *Artrinium* spp. ก. โคลนีสีเทา ข. ลักษณะ Conidia สีเข้มที่เกิดบน conidiophore
ค. ลักษณะ Conidiophore มีผนังกันสีเข้ม

Arthrographis sp. โคลนีสีเทาหรือสีขาว conidia (arthrospores) สีเข้ม รูปร่างกลม รูปไข่ หรือยาวรี เรียงต่อกันหลายเซลล์ (ภาพ 20)



ภาพ 20 arthrospores สีเข้มของ *Arthrographis* sp.

Cephalosporium sp. โคลนีสีขาว มีลักษณะฟูคล้ายกับไม่ฟู conidiophore ยาวเรียว เป็นแบบธรรมดา conidia (phialospores) ไม่มีสี มี 1 เซลล์ อยู่รวมกัน โดยมีเมือกใสหุ้มจนเห็นเป็น รูปกลมหรือรูปไข่ (ภาพ 21)



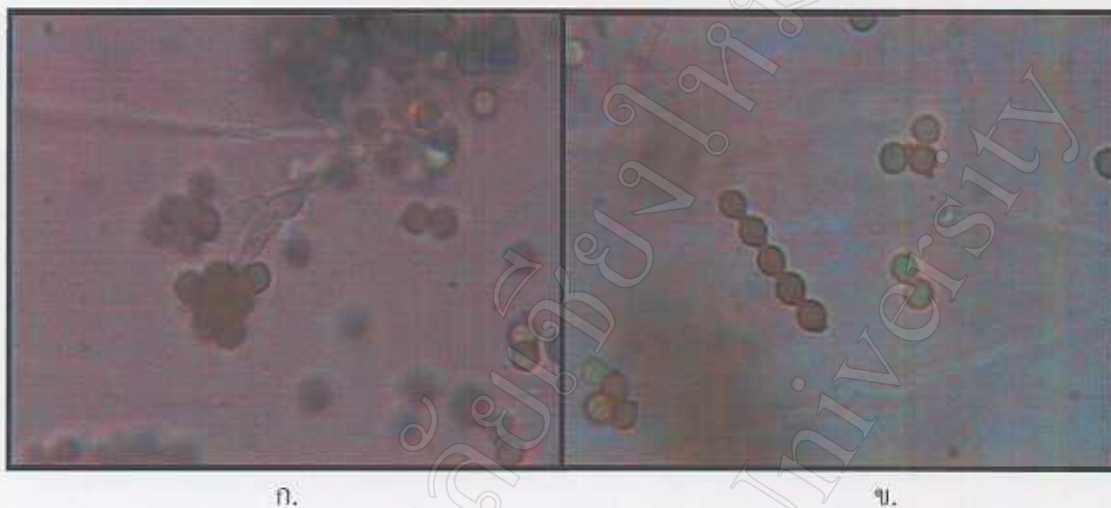
ก.



ข.

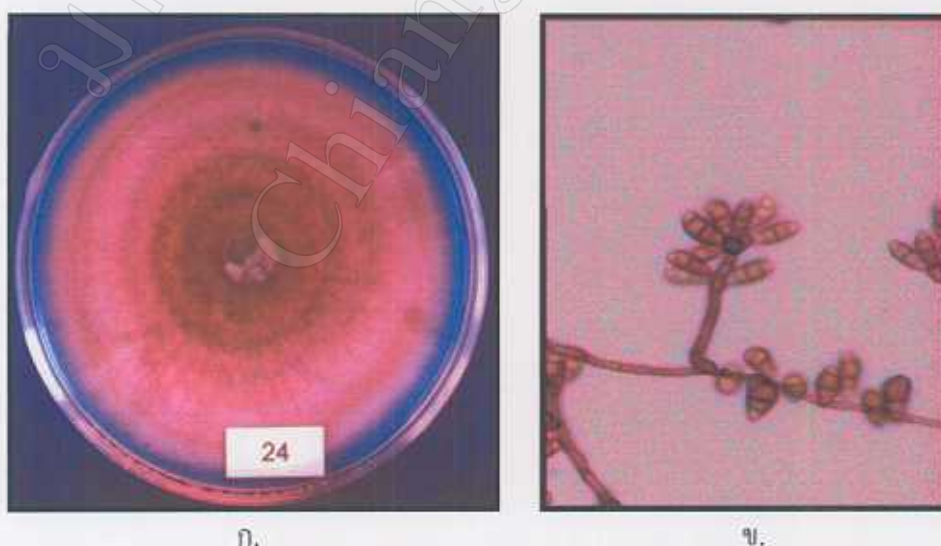
ภาพ 21 *Cephalosporium* sp. ก. โคลนีขาว ข. conidia สีไม่มีสีที่อยู่รวมกัน โดยมีเมือกหุ้ม

Penicillium sp. โคลนีสีเขียว conidiophore เกิดจาก somatic hypha มักขึ้นมาเดี่ยวๆ มีน้อยที่เป็นแบบ synnemata แดกกึ่งก้านตอนปลายทำให้มีลักษณะคล้ายแปรง สร้างสปอร์บน phialides conidia สีหรือมีสีสด ต่อกันเป็นสายคล้ายโซ่ รูปกลมหรือรี (ภาพ 22)



ภาพ 22 *Penicillium* sp. ก. conidia ที่เกิดบน phialide ข. conidia เชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ด้วย connective cell

Curvularia sp. โคลนีสีเทาเขียวหรือสีน้ำตาล เส้นใยค่อนข้างฟู conidiophore สีน้ำตาลอาจเป็นแบบเดี่ยวหรือแบบแตกกิ่งก้าน conidia สีเข้ม มี 3-5 เซลล์ มักโค้งงอ เซลล์กลางมีขนาดใหญ่ เซลล์ที่อยู่ปลายมีสีจางกว่าเซลล์อื่นๆ (ภาพ 23)



ภาพ 23 *Curvularia* sp. ก. โคลนีสีเทา ข. Conidia สีเข้มที่เกิดบน conidiophore

Drechslera spp. โคลนีสีเทา เส้นใยค่อนข้างฟู conidiophore สีเข้ม มีผนังกัน สร้าง conidia (porospores) สีเข้ม มีหลายเซลล์ (phragmosporous) รูปร่างทรงกระบอก ส่วนหัวกลมมน มีขนาดเล็กกว่าส่วนท้าย (ภาพ 24)



ก.



ข.

ภาพ 24 *Drechslera* spp. ก. โคลนีสีเทา ข. Conidia สีเข้มที่เกิดบน conidiophore

Pestalotiopsis sp. โคลนีสีขาว conidia สีเข้มหรือสีน้ำตาล รูปร่างยาวรี มีหลายเซลล์ เซลล์ที่อยู่ปลายทั้งสองด้านแหลมและไม่มีสี มีระยะยักที่ปลาย 2-3 เส้นหรือมากกว่า (ภาพ 25)



ก.

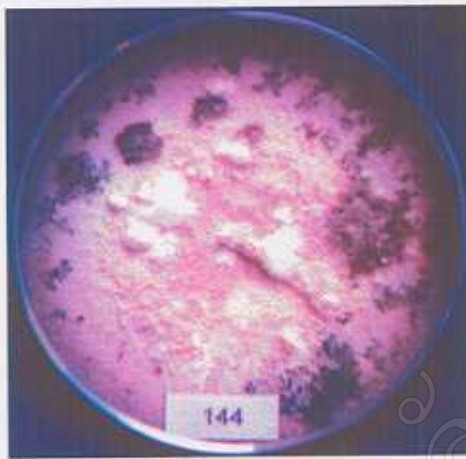


ข.

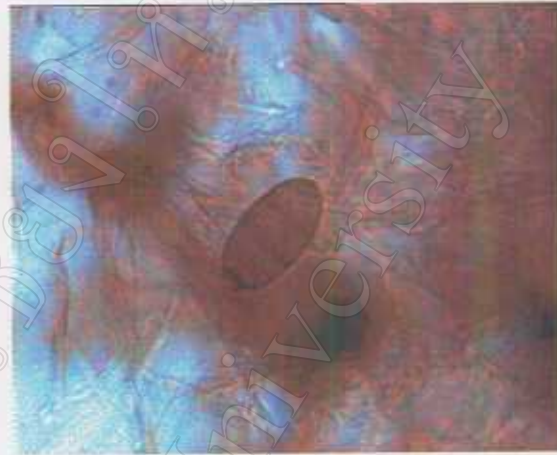
100x

ภาพ 25 *Pestalotiopsis* sp. ก. โคลนีสีขาว ข. Conidia สีเข้ม มีระยะยัก

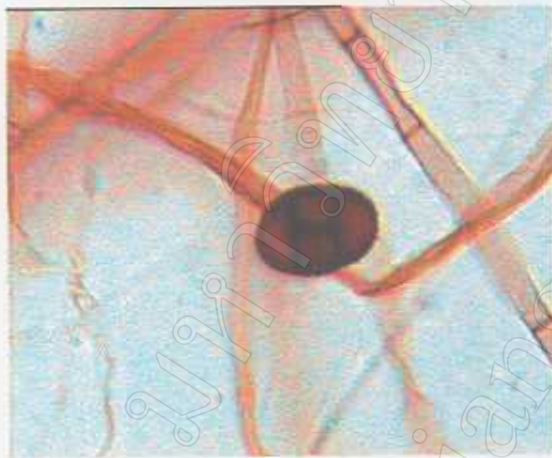
Pithomyces spp. โคลนีสีขาว เส้นใยค่อนข้างฟู conidiophore ตื้นสีไม่เข้ม เกิด
เดี่ยวๆ บนเส้นใยเรียงสลับกันทั้งสองข้างของเส้นใย conidia (aleuriospores) ที่เข้ม มีหลายเซลล์
(dictyosporous) อาจมี 3-6 เซลล์ รูปไข่หรือยาวรี จนถึงรูปร่างไม่แน่นอน (ภาพ 26)



ก.



ข.



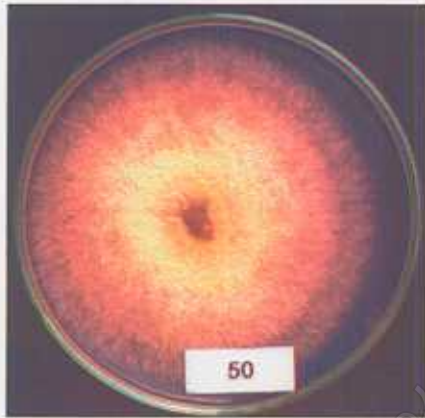
ค.



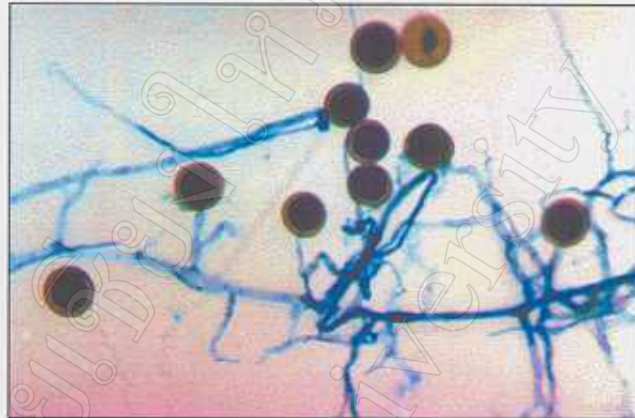
ง.

ภาพ 26 *Pithomyces* spp. ก. โคลนีสีขาว ข. conidia ที่มี 3 เซลล์ ค. conidia ที่มี 4 เซลล์
ง. conidia ที่มี 6 เซลล์ มีผนังกันทั้งตามยาวและขวาง

Harknessia sp. โคลนีสีน้ำตาลอ่อน หรือสีส้มชมพู เส้นใยบางติดแน่นกับ
ผิวอาหาร เส้นใยสีหรือสีน้ำตาลอ่อน conidiophore สีหรือสีน้ำตาลอ่อน เป็นแบบธรรมดา ไม่มี
ผนังกัน conidia สีน้ำตาล รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม (ภาพ 27)



ก.



ข.

ภาพ 27 *Harknessia* sp. ก. โคลนีสีน้ำตาลอ่อน ข. conidia สีน้ำตาล เส้นใยสีน้ำตาล (ย้อมติดสี cotton blue)

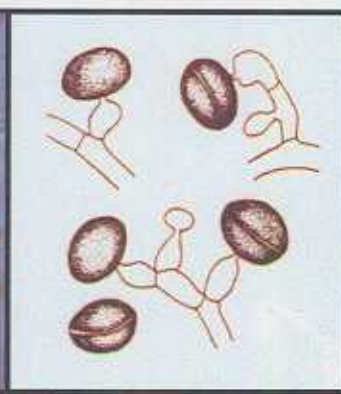
Nigrospora sp. โคลนีสีขาวเมื่อแก่กลายเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาล เส้นใยสีน้ำตาล
เข็ม conidiophore ตัวยาว conidia (aleuriospores) สีเข็ม รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม มีเซลล์
ลักษณะคล้ายถุงโตเกิดบนส่วนปลายของ conidiophore (ภาพ 28)



ก.



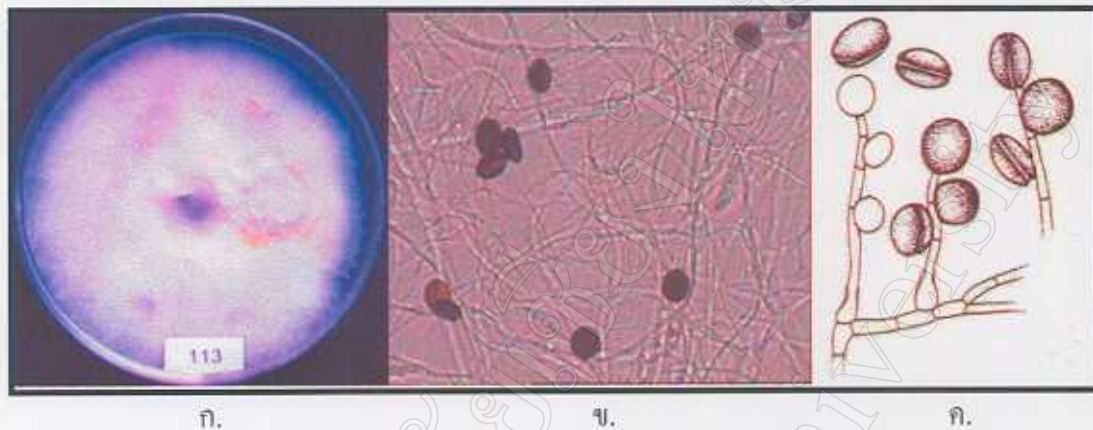
ข.



ค.

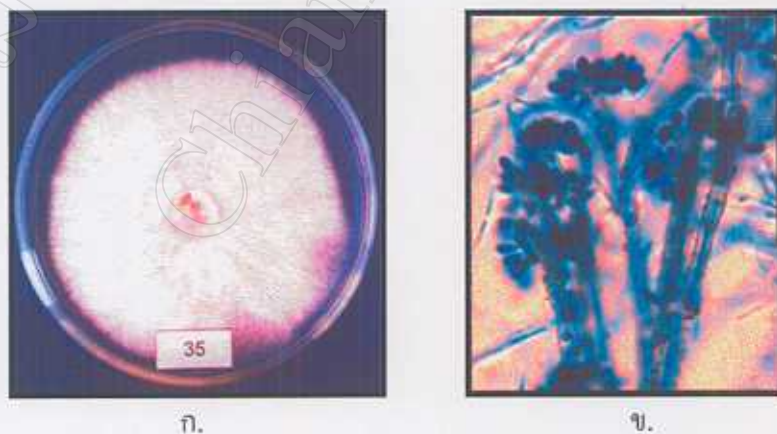
ภาพ 28 *Nigrospora* sp. ก. โคลนีสีขาว ข. conidia สีเข็ม ค. ลักษณะการเกิด conidia บน
conidiophore ตัวยาว (ภาพจากหนังสือของ Von Ark, 1981)

Papularia spp. โคลนีสีขาว เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมักไม่ค่อยสร้าง conidiophore conidiophore อาจเป็นแบบยาวเรียว มีผนังกัน หรือเกิดเป็นเส้นสั้นๆบนเส้นสาย conidia สีเข้ม มี 1 เซลล์ รูปไข่หรือรูปกลม ลักษณะ conidia ด้านข้างมักมีแถบใสด้วย (ภาพ 29)



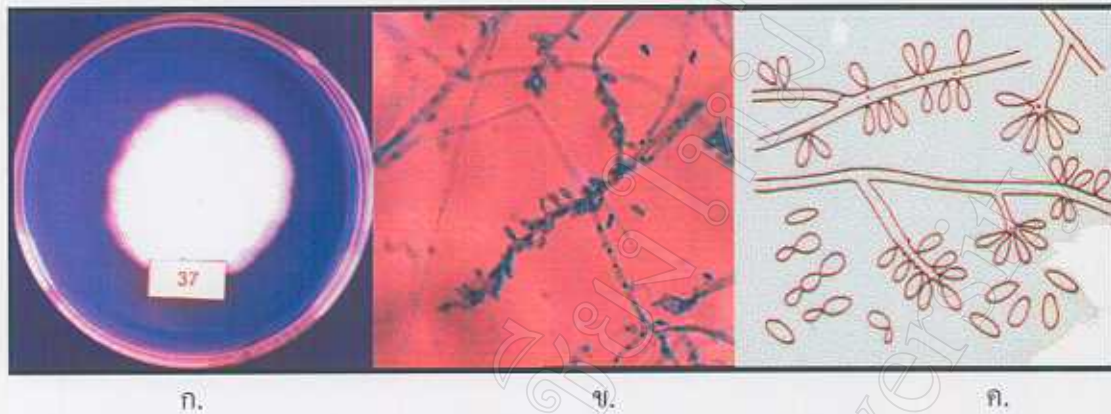
ภาพ 29 *Papularia* spp. ก. โคลนีสีขาว ข. conidia สีเข้ม ค. ลักษณะการเกิด conidia บน conidiophore ที่มีผนังกัน (ภาพจากหนังสือของ Von Ark, 1981)

Gonatobotry sp. โคลนีสีขาว conidiophore ตั้งตรง บางครั้งยาว มีผนังกัน แตกสาขาแบบธรรมดาหรือแตกเป็นสาขาย่อย มีลักษณะโป่งพองออกเป็นช่วงๆจนถึงส่วนปลายของ conidiophore และมีก้านชูลักษณะเป็นซี่เล็กๆ conidia ออกมาแบบเดี่ยวๆ แต่มี conidia เกิดบนบริเวณดังกล่าวก่อนข้างหนาแน่น conidia ไม่มีสี มี 1 เซลล์ รูปไข่หรือค่อนข้างกลม (ภาพ 30)



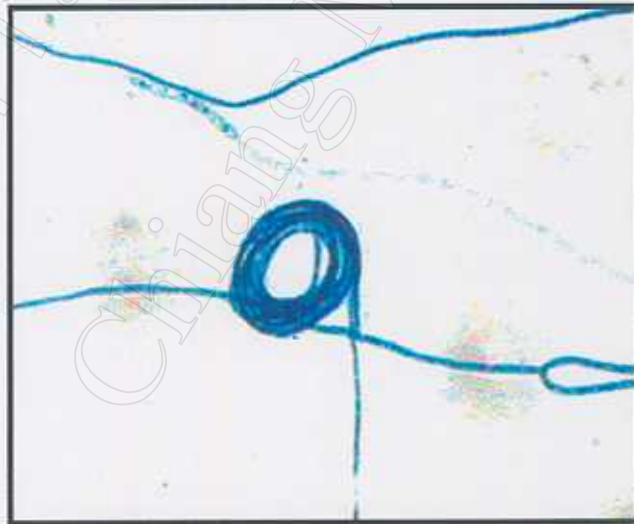
ภาพ 30 *Gonatobotry* sp. ก. โคลนีสีขาว ข. conidia สี รูปไข่ที่เกิดบนบริเวณที่โป่งออกเป็นช่วงๆจนถึงส่วนปลายของ conidiophore (ย้อมคัลสี cotton blue)

Sporothrix sp. โคลนีสีขาว conidiophore ส่วนใหญ่เป็นแบบธรรมดา แต่อาจมี
ผนังกัน conidia (sympodulospores) ใส มี 1 เซลล์ รูปกลมหรือรูปไข่ เกิดบนซี่สั้นๆ (ภาพ 31)



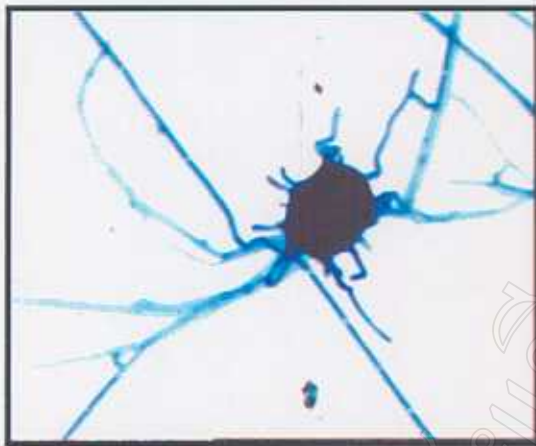
ภาพ 31 *Sporothrix* sp. ก. โคลนีสีขาว ข. conidia ใส (ย้อมติดสี cotton blue) ค. ลักษณะการ
เกิด conidia แบบต่างๆ (ภาพจากหนังสือของ Von Ark, 1981)

Helicoon sp. conidiophore ขาวเรียว เป็นแบบธรรมดาหรือแตกสาขา ใสไม่มีสี
หรือมีสีเข้ม conidia (blastospore or sympodulospores) ใสไม่มีสีหรือสีเข้ม ขดเป็นวง (ภาพ 32)

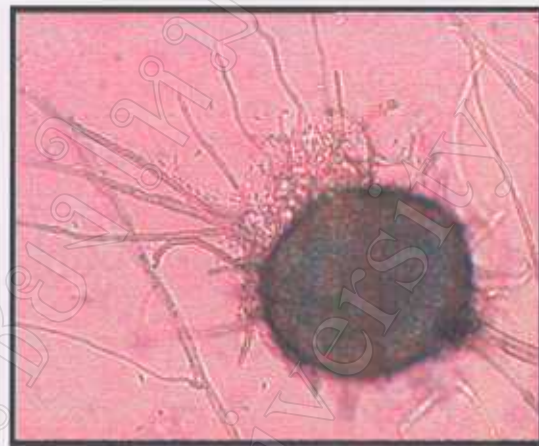


ภาพ 32 ลักษณะ conidia ขดเป็นวงบน conidiophore ขาวเรียว ของ *Helicoon* sp.

Chaetasbolista sp. โคโลนีสีน้ำตาล pycnidia สีเข้ม ที่ผิวของ pycnidia มี saetae
หลายเส้น conidia ไม่มีสี มี 1 เซลล์ รูปไข่ (ภาพ 33)



40x



100x

ก.



ข.

ภาพ 33 *Chaetasbolista* sp. ก. pycnidia สีเข้มที่มี saetae อยู่ด้วย ข. conidia ไม่มีสี (ย้อมสี cotton blue)

4. ผลการคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดหนึ่งชนิดใดได้สูงโดยวิธี gel diffusion assay

เมื่อนำเชื้อรา endophyte จำนวน 12 ไอโซเลทมาเลี้ยงในอาหารเหลว cultivation medium ที่มีสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน (substrate) คือ cellulose, inulin, xylan และ locust bean gum แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาตรวจการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่มี locust bean gum ให้วงใสชัดเจนและมีขนาดใหญ่กว่า 15 mm จำนวน 58.33% สำหรับ cellulose และ xylan ให้วงใสขนาดเล็กกว่า 15 mm คิดเป็นจำนวน 100% และ 91.67% ตามลำดับ และ inulin ไม่พบวงใสเกิดขึ้นเลยบนจาน phytagel ที่มี substrate นั้นๆ ผสมอยู่ แต่บนจานที่มี phytagel อย่างเดียวพบวงใสที่ภายในวงใสมีวงสีอื่น (สีคล้ำ) ประปนอยู่ด้วย ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า 15 mm เมื่อหยอดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อจากอาหารที่มี cellulose, locust bean gum, xylan และ inulin คิดเป็นจำนวน 91.67%, 50.00%, 16.67% และ 0.00% ตามลำดับ สำหรับบนจานอาหารวุ้นและจานอาหารวุ้นที่มี substrate แต่ละชนิดก็ให้ผลทำนองเดียวกันและให้ค่าไม่แตกต่างกับจาน phytagel และจาน phytagel ที่มี substrate เหล่านั้นผสมอยู่ตามลำดับ แฉวงใสไม่ค่อยชัดเจน ทำให้วัดขนาดได้ยาก (ตาราง 6)

ตาราง 6 เปอร์เซนต์จำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสขนาดต่างๆ ในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี gel diffusion โดยใช้ gel (agar หรือ phytagel) ที่มี substrate แตกต่างกัน 4 ชนิด

Substrate	%จำนวนไอโซเลทที่ให้วงใสบน agar plate ขนาดต่างๆ (mm)			%จำนวนไอโซเลทที่ให้วงใสบน agar+substrate plate ขนาดต่างๆ (mm)			%จำนวนไอโซเลทที่ให้วงใสบน phytagel plate ขนาดต่างๆ (mm)			%จำนวนไอโซเลทที่ให้วงใสบน phytagel+substrate plate ขนาดต่างๆ (mm)		
	0	1.-14	>15	0	1.-14	>15	0	1.-14	>15	0	1.-14	>15
Cellulose	0	0	100	0	100	0	0	8.33	91.67	0	100	0
Inulin	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Xylan	100	0	0	0	100	0	8.33	41.67	50.00	8.33	91.67	0
Locust bean gum	41.67	16.67	41.67	16.67	25.00	58.33	41.67	41.67	16.67	0	41.67	58.33

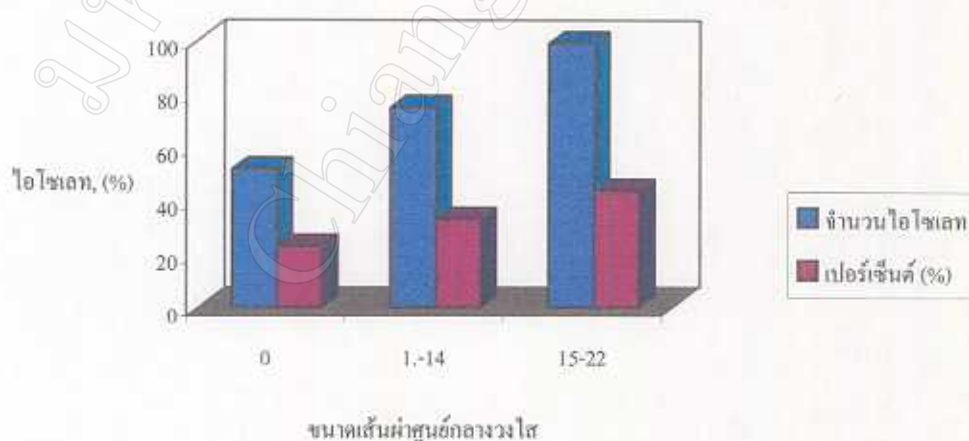
ดังนั้นจึงเลือกศึกษาการผลิต mannanase ของ endophytic fungi ที่แยกได้จากไม้ต่างๆ ต่อไป เนื่องจากการคัดเลือกว่าด้วยวิธี gel diffusion นี้ให้วงใสที่ชัดเจนไม่มีวงสีอื่นปะปนและมีขนาดใหญ่กว่า 15 mm ซึ่งง่ายต่อการสังเกตผลและวัดขนาดทำให้ผลที่ได้มีความผิดพลาดน้อย

5. ผลการคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่ผลิต mannanase ได้สูง โดยวิธี gel - diffusion

เมื่อนำเชื้อรา endophyte จำนวน 226 ไอโซเลทมาเพาะเลี้ยงใน cultivation medium ที่มี 1% w/v ของ locust bean gum เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาตรวจการผลิต mannanase ด้วยวิธี gel diffusion พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ให้วงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 15 mm รองลงมาคือขนาด 1-14 และ 0 mm ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 43.8%, 33.2%, และ 23% ตามลำดับ (ตาราง 7 ภาพ 34) จึงคัดเลือกตัวแทนจำนวน 5 ไอโซเลทที่คาดว่าจะผลิต mannanase ได้ดี ไปทดสอบในขั้นตอนถัดไป

ตาราง 7 จำนวนไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่าศูนย์กลางวงใสขนาดต่างๆ ในการตรวจวัด mannanase activity ของเชื้อรา 226 ไอโซเลทด้วยวิธี gel diffusion

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (mm)	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ (%)
0	52	23.0
1-14	75	33.2
15-22	99	43.8
รวม	226	100.0



ภาพ 34 จำนวนไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์จำนวนเชื้อราที่ให้เส้นผ่าศูนย์กลางวงใสขนาดต่างๆ ในการตรวจวัด mannanase activity ของเชื้อรา 226 ไอโซเลทด้วยวิธี gel diffusion

6. ผลการคัดเลือกเชื้อรา endophyte ที่ผลิต mannanase ได้สูง โดยวิธี DNS

method

เมื่อนำเชื้อรา endophyte ที่ให้วงใสขนาด 22 mm ในการทดสอบโดยวิธี gel diffusion จำนวน 5 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิต mannanase โดยหมักในอาหารเหลว cultivation medium บ่มไว้บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 4 วัน แล้วตรวจวัด mannanase activity ปริมาณโปรตีน พบว่าเชื้อราไอโซเลท GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุด อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% กล่าวคือมีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.27 U/ml และมีค่า specific activity เท่ากับ 22.16 U/mg รองลงมาได้แก่ GnCMU339 และ DaCMU598 มีค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 3.82 และ 3.85 U/ml ตามลำดับ ส่วน BvCMU133 และ DmCMU490 มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.72 และ 0.53 U/ml ตามลำดับ (ตาราง 8-9 ภาพ 35)

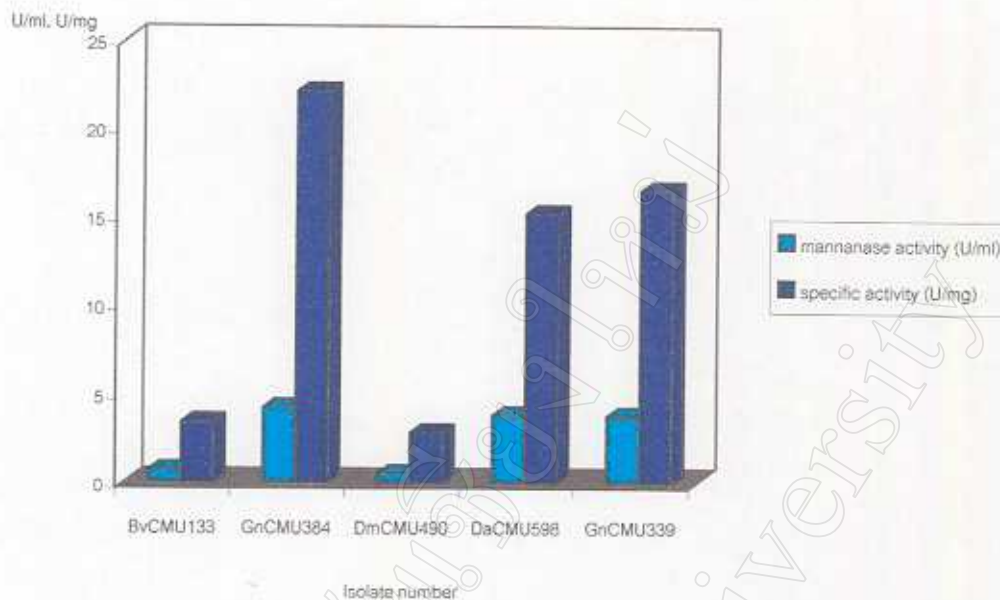
ตาราง 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของเชื้อรา 5 ไอโซเลทในการตรวจวัดโดยวิธี DNS method

	Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Activity	Between Groups	40.933	4	10.233	735.493	0.000***
	Within Groups	0.139	10	1.391E-02		
	Total	41.072	14			
Specific Activity	Between Groups	872.935	4	218.234	228.200	0.000***
	Within Groups	9.563	10	0.956		
	Total	882.498	14			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 9 ค่า enzyme activity และ specific activity จากการตรวจวัดโดยวิธี DNS method และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ตรวจวัดโดยวิธี gel diffusion ของเชื้อรา 5 ไอโซเลท

Isolate number of test fungi	Clear zone diameter (mm)	Mannanase activity (U/ml)	specific activity (U/mg)
BvCMU133	22	0.72c	3.44c
GnCMU339	22	3.82b	16.56b
GnCMU384	22	4.27a	22.16a
DmCMU490	22	0.53c	2.87c
DaCMU598	22	3.85b	15.23b



ภาพ 35 ค่า mannase activity และ specific activity ของเชื้อรา 5 ไอโซเลตในการตรวจวัดโดยวิธี DNS method

จากผลที่ได้นี้จึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลต GnCMU384 ที่ได้จากข้อของกิ่งไม้หูกเครือ (*Gigantochloa nigro-ciliata* (Munro) Kurz) บริเวณน้ำคกมณฑาธารบนดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อศึกษาลักษณะและความสามารถของเชื้อ หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต mannase ต่อไป

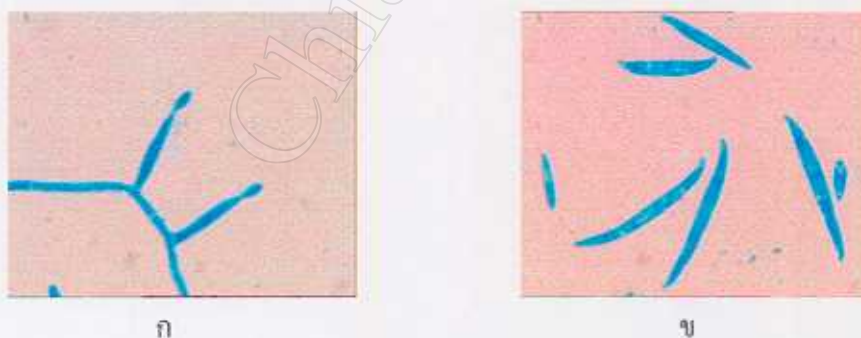
7. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา endophyte ไอโซเลต GnCMU384 บนอาหารแข็ง และการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โครงสร้างสืบพันธุ์เพื่อบ่งบอกชนิดระดับ Genus

หลังจากเลี้ยงเชื้อไอโซเลต GnCMU384 บนอาหาร PDA, CMA, MA with rose bengal, LBA, และ WA ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 6 วัน พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA รองลงมาได้แก่ WA ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว CMA และ LBA แต่บน CMA โคโลนีมีลักษณะบางมาก สำหรับ MA with rose bengal เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำสุดและโคโลนีมีลักษณะบางติดแน่นกับอาหาร (ภาพ 36)



ภาพ 36 ลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลท GnCMU384 บนอาหาร PDA, CMA, MA with rose bengal, LBA, และ WA ที่โรยด้วยเมล็ดข้าวเหนียว บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 6 วัน

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่บน PDA มีสีขาวอมม่วง ได้ข้าวอาหารมีสีม่วง เส้นใยมีผนังกัน สร้างสปอร์สี 2 แบบคือ microconidia ขนาดกว้างและยาวประมาณ $2.5 \times 5-12.5 \mu\text{m}$ ที่เกิดบน monophialide และ macroconidia มีลักษณะโค้งเล็กน้อยเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว ขนาดกว้างและยาวประมาณ $2.5-3 \times 15-30 \mu\text{m}$ มีผนังกันสปอร์จำนวน 3 เส้น (ภาพ 37) และสร้าง chlamydospore เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้จัดเป็นลักษณะประจำของ *Fusarium* sp.



ภาพ 37 ลักษณะ microconidia (ก) และ macroconidia (ข) ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

8. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp.

GnCMU384

เมื่อศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการผลิต mannanase ได้แก่ สูตรอาหารพื้นฐาน สำหรับผลิต mannanase ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน pH อาหารเริ่มต้น ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมและเวลาที่เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดปรากฏผลดังนี้

8.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp.

GnCMU384

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium 3 สูตร บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิต mannanase ได้ในอาหารทั้ง 3 สูตร เมื่อตรวจวัด mannanase activity ปริมาณโปรตีน พบว่าอาหาร สูตร 3 ทำให้เชื้อนี้ผลิต mannanase ได้สูงสุด แต่มีค่าไม่แตกต่างจากสูตร 1 อย่างมีนัยสำคัญที่ ความเชื่อมั่น 95% และสูตรที่ 2 ทำให้ผลิต mannanase ได้ต่ำสุดคั้งนี้คือ มีค่า mannanase activity เท่ากับ 4.88, 4.55, และ 2.21 U/ml, specific activity เท่ากับ 12.60, 9.81, และ 8.25 U/mg ตามลำดับ (ตาราง 10-11 ภาพ 38)

ตาราง 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อเลี้ยงใน cultivation medium 3 สูตร

Source		Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	13.199	2	6.599	76.926	0.000***
	Within Groups	0.515	6	8.579E-02		
	Total	13.714	8			
Specific Activity	Between Groups	37.543	2	18.772	22.326	0.002***
	Within Groups	5.045	6	0.841		
	Total	42.588	8			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 11 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium 3 สูตร

สูตรอาหาร	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
1	4.65a	0.39	12.02a
2	2.27b	0.26	8.82b
3	4.99a	0.36	13.76a



ภาพ 38 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium 3 สูตร

8.2 ผลการศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), NaNO_3 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), corn steep solid 0.1% (w/v), pH 5.5 และมีแหล่งคาร์บอนต่างกัน 13 ชนิด ปริมาณ 1% (w/v) พบว่าเชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงใน cultivation medium ที่มี locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือแป้งบุก ซึ่งให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 4.36 และ 2.97 U/ml และค่า specific activity เท่ากับ 14.99 และ 8.12

U/mg ตามลำดับ สำหรับ glucose, galactose, mannose, manitol, soluble starch, mannan จาก *Acacia variabilis*, mannan จาก *A. campanulatus*, แป้งข้าวเหนียว, แป้งข้าวเจ้า, ข้าวโพดป่น, และ Arabic gum ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ประมาณ 0.08-0.21 U/ml และมีค่า specific activity ประมาณ 0.11-0.61 U/mg แต่ในอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้เลย (ตาราง 12-13 ภาพ 39)

ตาราง 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

Source		Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	53.819	13	4.140	65.532	0.000***
	Within Groups	1.706	27	6.317E-02		
	Total	55.525	40			
Specific Activity	Between Groups	547.435	13	42.110	389.742	0.000***
	Within Groups	2.917	27	0.108		
	Total	550.353	40			

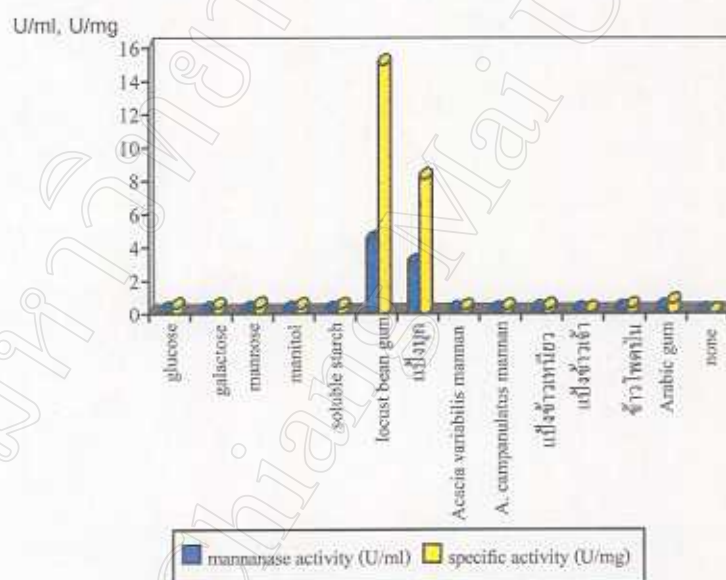
*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 13 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน

C-source	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
1. glucose	0.09c	0.25	0.35c
2. galactose	0.09c	0.27	0.34c
3. mannose	0.11c	0.28	0.39c
4 manitol	0.11c	0.33	0.33c
5. soluble starch	0.10c	0.27	0.35c
6. locust bean gum	4.36a	0.19	14.99a

ตาราง 13 (ต่อ)

C-source	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
7. แป้งบุก	2.97b	0.38	8.12b
8. <i>Acacia variabilis</i> mannan	0.12c	0.51	0.24c
9. <i>A. campanulatus</i> mannan	0.08c	0.29	0.27c
10. แป้งข้าวเหนียว	0.14c	0.47	0.30c
11. แป้งข้าวเจ้า	0.09c	0.78	0.11c
12. ข้าวโพดป่น	0.17c	0.50	0.34c
13. Arabic gum	0.21c	0.16	0.61c
14. none C-source	0.00c	0.35	0.00c



ภาพ 39 ค่า mannase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ locust bean gum เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์

8.3 ผลการศึกษาปริมาณ locust bean gum ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมใน

การผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), NaNO_3 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), corn steep solid 0.1% (w/v), pH 5.5 และมีปริมาณ locust bean gum ที่เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆกันคือ 0, 0.5, 1.0..., 5.0% พบว่าอาหารที่ปริมาณ locust bean gum 5.0% ทำให้เชื้อราไอโซเลท GnCMU384 ผลิต mannanase ได้สูงสุด ส่วนที่มี 3.0% แม้ว่าจะมีค่าการทำงานของเอนไซม์ต่ำกว่าคือเท่ากับ 12.38 U/ml แต่ให้ค่า specific activity สูงสุดคือเท่ากับ 24.30 U/mg (ตาราง 14-15 ภาพ 40)

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงใช้ locust bean gum 3.0% ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์

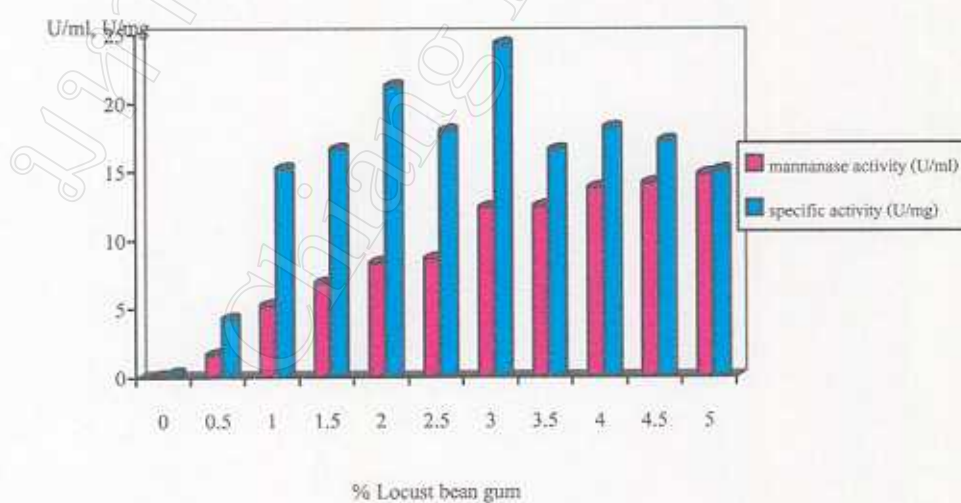
ตาราง 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างๆกัน

Source		Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	672.595	10	67.259	75.523	0.000***
	Within Groups	16.031	18	0.891		
	Total	688.625	28			
Specific Activity	Between Groups	1446.619	10	144.662	23.439	0.000***
	Within Groups	111.095	18	6.172		
	Total	1557.714	28			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 15 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างๆกัน

Locust bean gum (%w/v)	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
0.0	0.06e	0.21	0.27c
0.5	1.60e	0.38	4.19c
1.0	5.16d	0.34	15.19b
1.5	6.84cd	0.41	16.62ab
2.0	8.31c	0.39	21.25ab
2.5	8.62c	0.49	17.96ab
3.0	12.38b	0.51	24.30a
3.5	12.45b	0.50	16.58ab
4.0	13.81ab	0.51	18.19ab
4.5	14.15ab	0.55	17.24ab
5.0	14.79a	0.65	15.09b



ภาพ 40 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ locust bean gum ต่างๆกัน

8.4 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ

Fusarium sp. GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v), pH 5.5 และมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน 9 ชนิด ปริมาณ 0.2% (w/v) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($28-30^\circ\text{C}$) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำ crude enzyme มาตรวจวัด mannanase activity ปริมาณโปรตีน พบว่าเชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95% เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่า enzyme activity เท่ากับ 9.81 U/ml และ specific activity เท่ากับ 21.96 U/mg รองลงมาคือ NaNO_3 ที่มี corn steep solid 0.1% (w/v) รวมอยู่ด้วย และ beef extract ส่วน yeast extract, soy bean powder, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ casein ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนและอาหารที่มี urea เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตาราง 16-17 ภาพ 41)

ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์

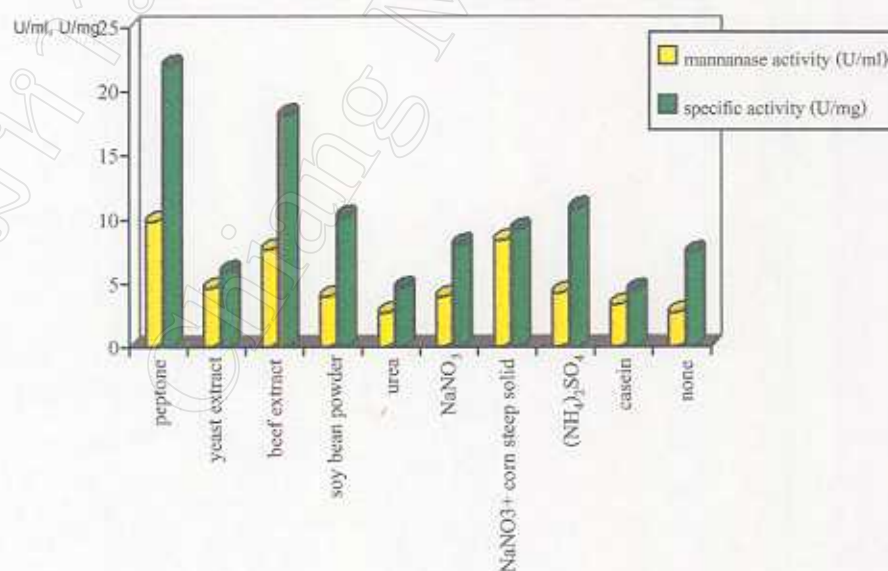
ตาราง 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด

	Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	115.420	9	12.824	57.761	0.000***
	Within Groups	2.220	10	0.222		
	Total	117.640	19			
Specific Activity	Between Groups	592.998	9	65.889	117.931	0.000***
	Within Groups	5.587	10	0.559		
	Total	598.585	19			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 17 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด

N-source	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
Peptone	9.81a	0.45	21.96a
yeast extract	4.61c	0.78	5.91cd
beef extract	7.62b	0.42	18.10b
soy bean powder	3.95cd	0.39	10.21c
urea	2.66d	0.58	4.63d
NaNO ₃	3.95cd	0.49	8.05cd
NaNO ₃ + corn steep solid	8.36b	0.91	9.25cd
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.25cd	0.39	10.87c
casein	3.31cd	0.74	4.48d
none	2.68d	0.36	7.41cd



ภาพ 41 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 9 ชนิด

8.5 ผลการศึกษาปริมาณ peptone ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต

mannanase ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (w/v), locust bean gum 3.0% (w/v), pH 5.5 และมีปริมาณ peptone ต่างๆกัน 11 ระดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3,...1.0% (w/v) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($28-30^\circ\text{C}$) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำ crude enzyme มาตรวจวัด mannanase activity พบว่าเชื้อราผลิต mannanase ได้สูงสุด 12.05 U/ml และมีค่า specific activity 4.73 U/mg เมื่อเลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone 0.9% (w/v) (ตาราง 18-19 ภาพ 42)

ดังนั้นจึงใช้ peptone 0.9% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ต่อไป

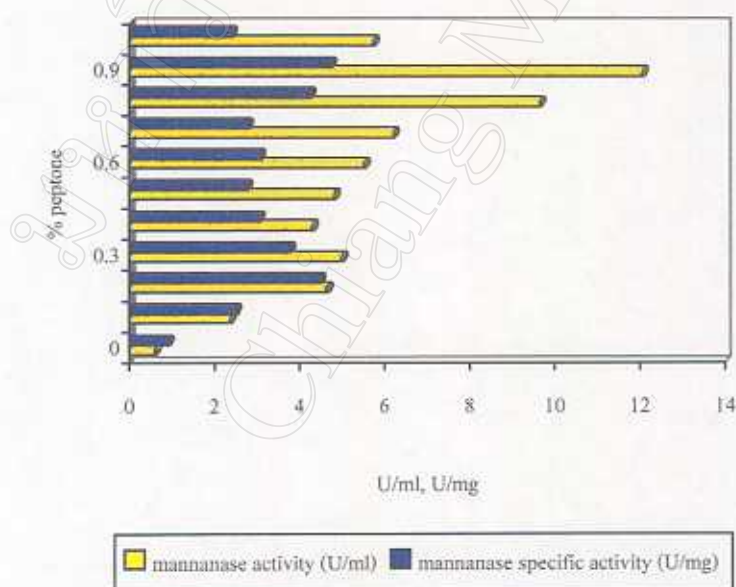
ตาราง 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน

Source		Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	273.464	10	27.346	45.019	0.000***
	Within Groups	11.541	19	0.607		
	Total	285.006	29			
Specific Activity	Between Groups	34.946	10	3.495	15.182	0.000***
	Within Groups	4.373	19	0.230		
	Total	39.319	29			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 19 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน

Peptone (%)	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
0.0	0.59f	0.66	0.90c
0.1	2.36e	0.94	2.50b
0.2	4.65cd	1.03	4.48ab
0.3	5.00cd	1.32	3.77ab
0.4	4.31d	1.37	3.05ab
0.5	4.82cd	1.73	2.77b
0.6	5.52cd	1.79	3.07ab
0.7	6.21c	2.23	2.78b
0.8	9.65b	2.26	4.24ab
0.9	12.05a	2.53	4.73a
1.0	5.73cd	2.38	2.39b



ภาพ 42 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีปริมาณ peptone ต่างกัน

8.6 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ

Fusarium sp. GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v) , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (v/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v) และมีระดับ pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆกันเป็น 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, และ 10 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เชย้าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำ crude enzyme มาตรวจวัด mannanase activity ปริมาณโปรตีน พบว่าเชื้อราผลิต mannanase ได้สูงเท่ากับ 12.67 U/ml และให้ค่า specific activity สูงสุดเท่ากับ 16.08 U/mg เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเป็นกลางเท่ากับ 7.0 ที่ pH 10 ซึ่งมีสภาพค่อนข้างเป็นด่างแม้ว่าจะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดแต่ให้ค่า specific activity ต่ำกว่า ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าค่าการทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มสูงขึ้นในช่วง pH 3-10 ส่วนค่า specific activity จะค่อยๆลดลงในอาหารที่มี pH ประมาณ 7-10 แต่ที่ pH 2.0 เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 20-21 ภาพ 35)

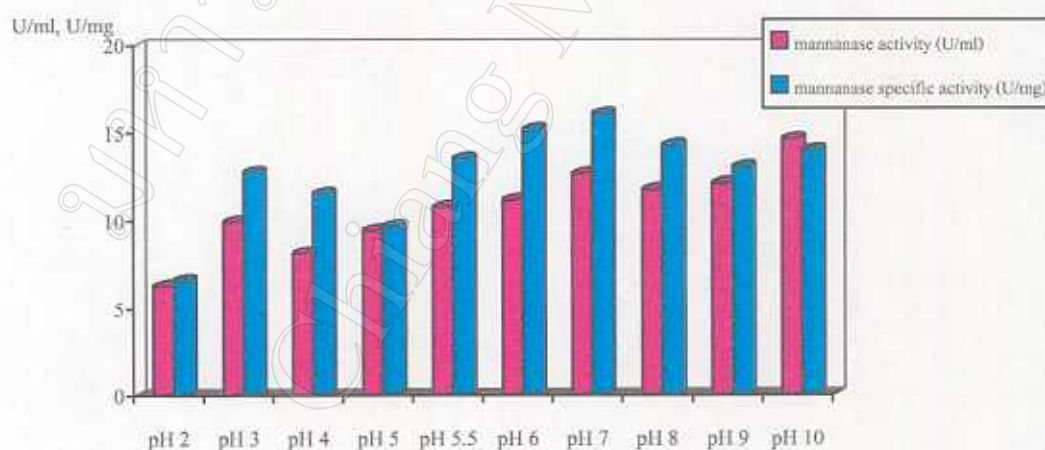
ตาราง 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

Source		Sum of Square	Df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	153.791	9	17.088	20.722	0.000***
	Within Groups	16.493	20	0.825		
	Total	170.283	29			
Specific Activity	Between Groups	210.504	9	23.389	13.174	0.000***
	Within Groups	35.508	20	1.775		
	Total	246.012	29			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 43 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

PH เริ่มต้น ของ cultivation medium	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
pH 2	6.26g	0.95	6.61e
pH 3	9.92de	0.78	12.73bc
pH 4	8.15f	0.71	11.53cd
pH 5	9.45ef	0.98	9.69d
pH 5.5	10.77cde	0.80	13.54bc
pH 6	11.17bcd	0.74	15.18ab
pH 7	12.67b	0.79	16.08a
pH 8	11.76bc	0.82	14.30ab
pH 9	12.12bc	0.94	13.06bc
pH 10	14.65a	1.05	14.01abc



ภาพ 43 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างกัน

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์เป็น 7.0

8.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต mannanase ของ *Fusarium* sp.

GnCMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GnCMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (w/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v), pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน เวลาที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำ crude enzyme มาตรวจวัด mannanase activity ปริมาณโปรตีน พบว่าเชื้อราที่ผลิต mannanase ได้ดีที่สุดและให้ค่า specific activity สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95% เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีค่าเท่ากับ 10.37 U/ml และ 9.50 U/mg ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ที่อุณหภูมิ 37°C และ 45°C ซึ่งให้ค่าการทำงานของเอนไซม์และ specific activity ใกล้เคียงกัน (ตาราง 22-23 ภาพ 44)

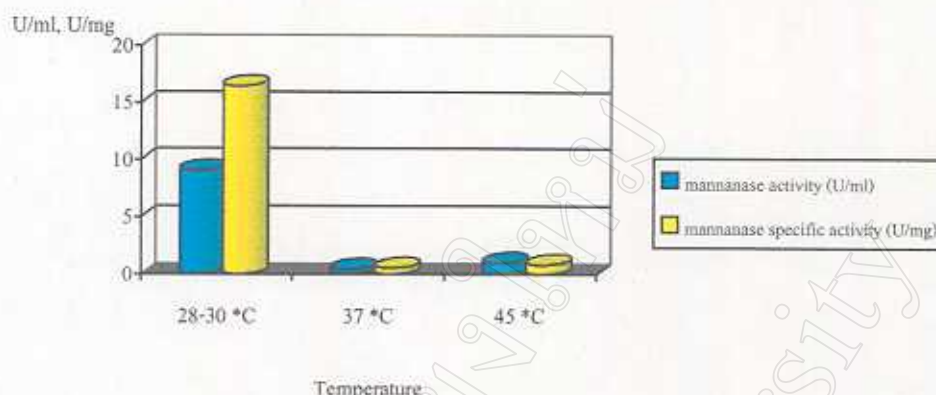
ตาราง 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium และบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน

	Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	186.741	2	93.371	186.957	0.000***
	Within Groups	2.997	6	0.499		
	Total	189.736	8			
Specific Activity	Between Groups	168.020	2	84.010	137.751	0.000***
	Within Groups	3.659	6	0.610		
	Total	171.679	8			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 23 ค่า pH crude enzyme, mannanase activity, ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

Incubation temperature (°C)	pH	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
อุณหภูมิห้อง (28-30 °C)	8.4	10.37a	1.10	9.50a
37 °C	9.1	0.45b	1.70	0.27b
45 °C	7.0	0.99b	2.50	0.40b



ภาพ 44 ค่า mannannase activity และ specific activity ของ *Fusarium* sp. GncMU384 ที่เลี้ยงใน cultivation medium ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน

8.8 ผลการศึกษาไคเนติกของการผลิต mannannase โดย *Fusarium* sp. GncMU384

เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Fusarium* sp. GncMU384 ใน cultivation medium ที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.2% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03% (w/v), trace metal solution 0.1% (w/v), locust bean gum 3.0% (w/v) และ peptone 0.9% (w/v), pH 7.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เมื่อเก็บตัวอย่าง crude enzyme ทุกๆ 12 ชั่วโมงจนถึงเวลา 132 ชั่วโมงมาตรวจวัด mannannase activity ปริมาณโปรตีนและหาหน้าหนักแห้งพบว่าเชื้อรานี้จะค่อยๆผลิต mannannase เพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 84 จะผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดและให้ค่า specific activity สูงสุดที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่าเท่ากับ 15.08 U/ml และ 8.99 U/mg ตามลำดับ หลังจากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์จะค่อยๆลดลงในชั่วโมงที่ 96 และเริ่มคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 108-132 หลังการบ่มเชื้อนาน 84 ชั่วโมงอาหารมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นโดยมี pH ประมาณ 8.29 เชื้อมีน้ำหนักแห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 84 (ตาราง 24-25 ภาพ 45) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในการเก็บเกี่ยวผลิตผลเอนไซม์จากเชื้อนี้ควรทำในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งจะให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด

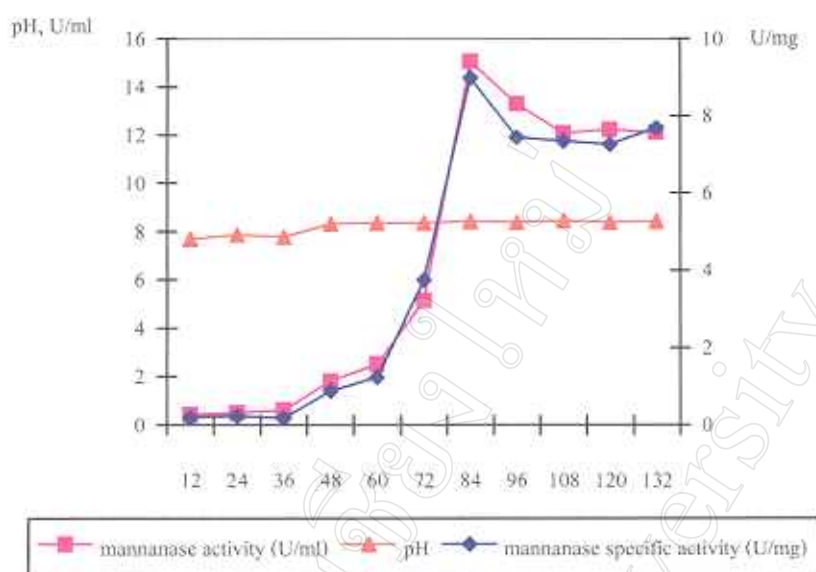
ตาราง 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity ในการศึกษาโคเนดิกของการผลิตเอนไซม์ของ *Fusarium* sp. GnCMU384

	Source	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	1038.538	10	103.854	71.676	0.000***
	Within Groups	30.428	21	1.449		
	Total	1068.966	31			
Specific Activity	Between Groups	381.913	10	38.191	75.253	0.000***
	Within Groups	10.658	21	0.508		
	Total	392.571	31			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 25 ค่า mannanase activity, specific activity, pH crude enzyme, ปริมาณโปรตีน และ น้ำหนักแห้งของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ในการศึกษาโคเนดิกของการผลิตเอนไซม์

Time (hr)	pH	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Dry weight (mg/ml)
12	7.72	0.43d	2.21	0.19d	403
24	7.88	0.51d	2.16	0.24d	419
36	7.80	0.61d	3.35	0.18d	430
48	8.33	1.82d	2.07	0.88d	475
60	8.37	2.53d	2.05	1.24d	478
72	8.38	5.16c	1.37	3.75c	498
84	8.44	15.08a	1.68	8.99a	535
96	8.39	13.32ab	1.79	7.44b	531
108	8.47	12.08b	1.64	7.34b	507
120	8.40	12.23b	1.69	7.26b	467
132	8.43	12.09b	1.57	7.69b	419



ภาพ 45 ค่า mannanase activity specific activity และ pH crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ในการศึกษาเอนไซม์ของการผลิตเอนไซม์

9. ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของ crude enzyme ของ

Fusarium sp. GnCMU384

ผลศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวบางประการของ crude enzyme mannanase ที่ได้จาก *Fusarium* sp. GnCMU384 ได้แก่ pH ของบัฟเฟอร์ ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ crude enzyme จะทำงานได้ดีที่สุด เป็นต้น

9.1 ผลการศึกษาผลของ pH ของบัฟเฟอร์

ในคราววัด mannanase activity โดยใช้ buffer 2 ชนิดที่มีค่า pH ต่างกันคือ sodium acetate buffer 0.1M pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, และ 8.0 และ phosphate buffer 0.1M pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ และวัดปริมาณโปรตีน พบว่าเมื่อใช้ 0.1M sodium acetate buffer pH ประมาณ 4.0-5.5 ทำให้ crude enzyme ทำงานดีขึ้น จนมีค่าการทำงานของเอนไซม์ดีที่สุดในสถานะเป็นกรดอ่อนคือ pH 6.5 และให้ค่า specific activity สูงสุดเช่นกันที่ความเข้มข้น 95% โดยมีค่าเท่ากับ 11.73 U/ml และ 8.88 U/mg ตามลำดับ แล้วจึงลดลงในช่วง pH ประมาณ 7.0-8.0 สำหรับ 0.1M phosphate buffer ก็เช่นเดียวกันกล่าวคือ ค่าการทำงานของเอนไซม์ใกล้เคียงกันในช่วงเป็นกรดอ่อน pH ประมาณ 6.0-6.5 จนได้ค่าสูงสุดในช่วง pH 7.0 และมีแนวโน้มลดลงใน buffer ที่เป็นด่าง

เพิ่มขึ้นคือ pH ประมาณ 7.5-8.0 อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่า 0.1M sodium acetate buffer ทำให้ crude enzyme ทำงานได้ดีกว่า 0.1M phosphate buffer (ตาราง 26-25 และภาพ 46)

ดังนั้นในการวัดการทำงานของ crude enzyme ของเชื้อนี้ครั้งต่อไปจึงใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5

ตาราง 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ buffer 2 ชนิดที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

Source		Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	62.590	13	4.815	12.085	0.000***
	Within Groups	5.976	15	0.398		
	Total	68.566	28			
Specific Activity	Between Groups	35.709	13	2.747	5.635	0.001***
	Within Groups	7.312	15	0.487		
	Total	43.020	28			

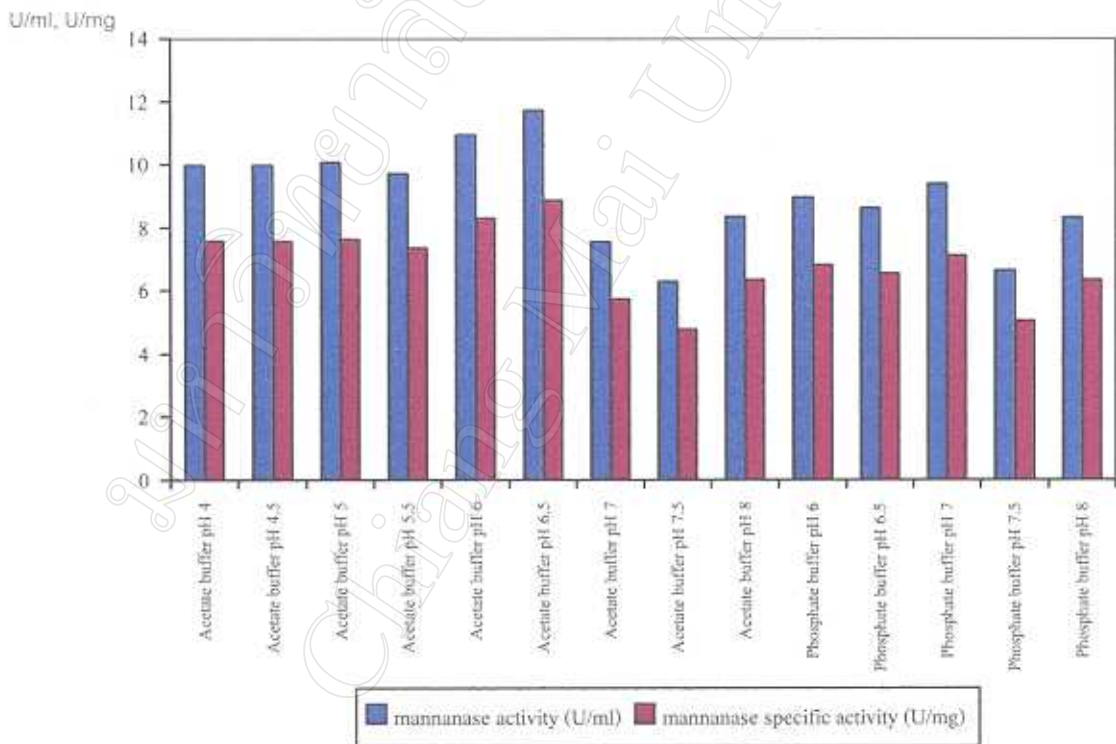
*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 27 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ buffer ที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที

pH buffer	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
Acetate buffer pH 4	9.99bc	1.32	7.57abc
Acetate buffer pH 4.5	9.98bc	1.32	7.56abc
Acetate buffer pH 5	10.07bc	1.32	7.62abc
Acetate buffer pH 5.5	9.71bcd	1.32	7.36abcd
Acetate buffer pH 6	10.94ab	1.32	8.30ab
Acetate buffer pH 6.5	11.73a	1.32	8.88a
Acetate buffer pH 7	7.55ef	1.32	5.73def

ตาราง 27 (ต่อ)

pH buffer	mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	specific activity (U/mg)
Acetate buffer pH 7.5	6.29f	1.32	4.78f
Acetate buffer pH 8	8.35de	1.32	6.35cdef
Phosphate buffer pH 6	8.98cde	1.32	6.82bcd
Phosphate buffer pH 6.5	8.63cde	1.32	6.54cde
Phosphate buffer pH 7	9.39cd	1.32	7.12bcd
Phosphate buffer pH 7.5	6.65f	1.32	5.04ef
Phosphate buffer pH 8	8.34de	1.32	6.32cdef



ภาพ 46 ถ้า mannase activity และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GncMU384 เมื่อใช้ buffer ที่มี pH ต่างกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที

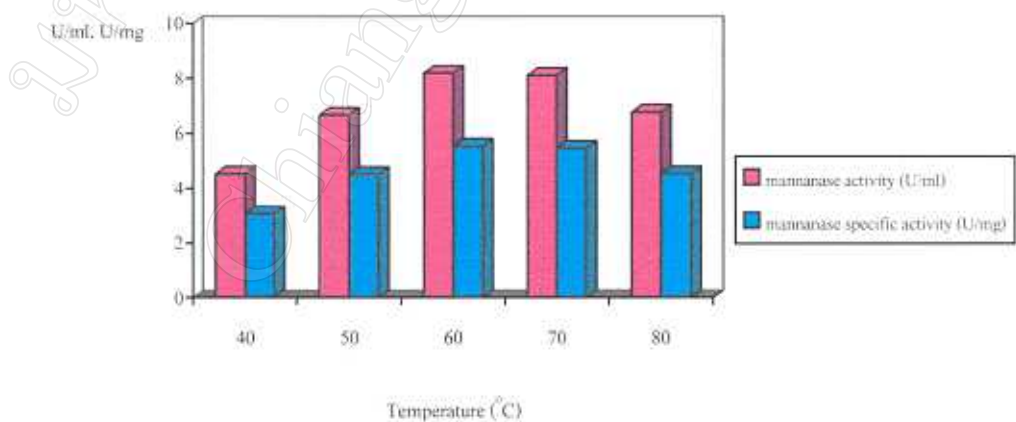
9.2 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิ

ในการตรวจวัด mannanase activity โดยใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆคือ 40, 50, 60, 70, และ 80°C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ค่อยๆสูงขึ้นเมื่อบ่ม reaction mixture ที่อุณหภูมิ 40 และ 50°C จนได้ค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60°C โดยมีค่าเท่ากับ 8.19 U/ml และให้ค่า specific activity เท่ากับ 5.53 U/mg รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 70°C ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมาก และมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 80°C ตามลำดับ (ตาราง 28 และภาพ 47)

ดังนั้นจึงพบว่า crude enzyme นี้จะทำงานได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60°C

ตาราง 28 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆกัน

Temperature (°C)	Mannanase activity (U/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	Specific activity (U/mg)
40°C	4.51	1.50	3.05
50°C	6.67	1.50	4.49
60°C	8.19	1.50	5.53
70°C	8.12	1.50	5.47
80°C	6.77	1.50	4.53



ภาพ 47 ค่า mannanase activity และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 7.0 บ่มนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิต่างๆกัน

9.3 ผลการศึกษาผลของช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา

ในการตรวจวัด mannanase activity ของ reaction mixture ที่ใช้ sodium acetate buffer 0.1M pH 6.5 บ่มที่ 60°C เป็นเวลา 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 และ 480 นาที พบว่าเมื่อบ่ม reaction mixture ใ้นาน 60 และ 120 นาที ทำให้ crude enzyme ทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าการทดลองที่ผ่านมาซึ่งบ่มใ้นาน 30 นาทีประมาณกว่า 2 เท่า และให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเท่ากับ 23.08 U/ml และมีค่า specific activity เท่ากับ 15.56 U/mg เมื่อบ่มใ้นาน 180 นาที เมื่อทดสอบต่อไปอีกในช่วงเวลานาน 300 จนถึง 520 นาที แม้ว่าจะให้ค่าการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นอีกแต่ไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 180 นาที ซึ่งคาดว่าผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มค่ากับเวลาในการบ่มที่นานเกินไปดังนั้นจึงไม่ได้ทำการทดลองต่อไป ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อบ่มใ้นาน 9 ชั่วโมงให้ค่าการทำงานของเอนไซม์และค่า specific activity สูงที่สุดเท่ากับ 33.74 U/ml และ 22.73 U/mg ตามลำดับ (ตาราง 29 และภาพ 48)

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม reaction mixture ของ crude enzyme นี้คือนานประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งจะทำได้เอนไซม์ปริมาณสูงในระดับหนึ่ง

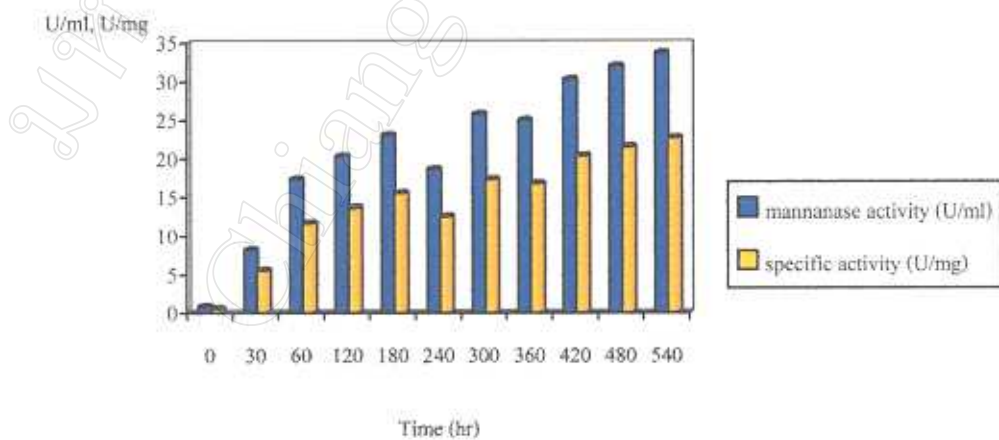
ตาราง 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของค่า mannanase activity และ specific activity crude enzyme ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GmCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน

Source		Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	3115.155	10	311.515	7.738	0.000***
	Within Groups	1046.714	26	40.258		
	Total	4161.869	36			
Specific Activity	Between Groups	1414.226	10	141.423	5.830	0.000***
	Within Groups	630.649	26	24.256		
	Total	2044.875	36			

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตาราง 30 ค่า mannanase activity ปริมาณโปรตีน และ specific activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน

Time (min)	mannanase activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	specific activity (U/mg)
0	0.85e	1.50	0.57e
30	8.19de	1.50	5.53de
60	17.33cd	1.50	11.65cd
120	20.31bc	1.50	13.69bcd
180	23.08abc	1.50	15.56abc
240	18.65cd	1.50	12.54cd
300	25.83abc	1.50	17.34abc
360	25.03abc	1.50	16.81abc
420	30.27ab	1.50	20.39abc
480	31.99a	1.50	21.59ab
540	33.74a	1.50	22.73a



ภาพ 48 ค่า mannanase activity ของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 เมื่อใช้ acetate buffer pH 6.5 บ่มที่ 60°C ในช่วงเวลานานต่างกัน

10. ผลการตรวจสอบผลิตผลจากการทำงานของ crude enzyme ของ *Fusarium* sp. GnCMU384 ด้วยวิธี TLC (thin layer chromatography)

เมื่อนำ crude enzyme มาบ่มกับ 1.0% locust bean gum แล้วนำมาตรวจสอบผลิตผลที่ได้โดยวิธี TLC เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า crude enzyme นี้สามารถย่อย substrate ให้เป็นสารโมเลกุลเล็กคือ galactose ดังภาพ 41



ภาพ 41 ผลิตผลที่ได้จากการทำงานของ crude enzyme ที่หมักใน 1% locust bean gum นาน 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี TLC หมายเลข 1-6 คือ สารมาตรฐานของ mannose, galactose, glucose, cellobiose, fructose, และ xylooligosaccharide ตามลำดับ ส่วนหมายเลข 7 คือ crude enzyme ที่หมักใน 1% locust bean gum และหมายเลข 8 คือ crude enzyme